

**Differentielle Übertragung der Begomoviren  
*Watermelon chlorotic stunt virus* und  
*Tomato yellow leaf curl virus* durch  
Populationen der Weiße Fliege  
(*Bemisia tabaci*)**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Mario Kollenberg

aus Beckendorf-Neindorf

1. Referent: Professor Dr. Dieter Jahn  
2. Referent: apl. Professor Dr. Reinhard Hehl  
eingereicht am: 09.04.2013  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 28.05.2013

Druckjahr 2013

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikation

Götz M, Popovski S, Kollenberg M, Gorovits R, Brown JK, Cicero JM, Czosnek H, Winter S, Ghanim M (2012):

Implication of *Bemisia tabaci* Heat Shock Protein 70 in Begomovirus-Whitefly Interactions. J Virol 86(24): 13241-13252

### Tagungsbeiträge

(Vortragende unterstrichen)

Kollenberg M, Götz M, Winter S:

Quantification and localization of Watermelon chlorotic stunt virus and Tomato yellow leaf curl virus in differently transmitting populations of the whitefly vector *Bemisia tabaci*. (Vortrag) 42. Jahrestreffen des DPG-Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen", Hannover (2010).

Kollenberg M, Götz M, Popovski S, Czosnek H, Winter S, Ghanim M:

Hsp70 implication in the transmission of mono- and bipartite begomoviruses by the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. (Vortrag) 43. Jahrestreffen des DPG-Arbeitskreises "Viruskrankheiten der Pflanzen", Braunschweig (2011).

Kollenberg M, Götz M, Winter S:

Quantification and localization of Watermelon chlorotic stunt virus and Tomato yellow leaf curl virus (*Geminiviridae*) in an efficiently and a poorly transmitting population of *Bemisia tabaci* (*Hemiptera, Aleurodidae*). (Vortrag) 4th European Whitefly Symposium, Israel (2011).

Zwei Wahrheiten können sich nie widersprechen.

Galileo Galilei

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Danksagung .....	VII
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Geminiviren und ihre Vektoren</b> ..... 6</li> <li>• <b>Interaktionen zwischen Begomoviren und <i>B. tabaci</i> Proteinen</b> .... 11</li> <li>• <b>Die Effizienz der Begomovirusübertragung zweier <i>B. tabaci</i> Populationen aus dem Sudan und Zielstellung dieser Arbeit</b> ..... 14</li> </ul>	
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 <b><i>B. tabaci</i> Populationen, Herkunft und Haltung</b> .....	16
2.2 <b>Probenahme von Weiße Fliegen</b> .....	17
2.3 <b>Synchronisierung von Weiße Fliegen</b> .....	17
2.4 <b>Präparation von Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen aus <i>B. tabaci</i></b> .....	17
2.5 <b>Isolation von Hämolymphe aus <i>B. tabaci</i></b> .....	19
2.6 <b>Extraktion von Nukleinsäure aus Weiße Fliegen, Wirtspflanzen und Bakterien</b> .....	20
2.6.1 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen nach Protokoll von Shahjahan <i>et al.</i> , (1995) .....	20
2.6.2 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels <i>DNeasy Plant Mini Kit</i> (QIAGEN) .....	21
2.6.3 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels <i>High Pure Template Preparation Kit</i> (Roche) .....	21
2.6.4 DNA-Extraktion aus Einzelindividuen nach Frohlich <i>et al.</i> , (1999) .....	22
2.6.5 RNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels <i>RNeasy Plant Mini Kit</i> (QIAGEN) .....	22
2.6.6 DNA-Extraktion aus Wirtspflanzen nach Dellaporta und <i>DNeasy</i> (QIAGEN) .....	23
2.6.7 DNA-Extraktion aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und Agro-Inokulation zur Virusinfektion von Pflanzen .....	24
2.6.7.1 Kultur von transgenen Agrobakterien mit WmCSV bzw. TYLCV .....	24
2.6.7.2 Infiltration von Wirtspflanzen .....	25

2.6.7.3	DNA-Extraktion aus Agrobakterien .....	26
2.6.8	Plasmid-DNA-Extraktion aus <i>Escherichia coli</i> nach dem <i>NucleoSpin Plasmid Protocol</i> (MACHEREY-NAGEL) .....	27
<b>2.7</b>	<b>Agarose-Gelelektrophorese .....</b>	<b>28</b>
<b>2.8</b>	<b>Speziesbestimmung durch Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom-Oxidase I (mtCOI) Gens .....</b>	<b>29</b>
2.8.1	Ligation der PCR Produkte .....	30
2.8.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i> Zellen durch Elektroporation .....	31
2.8.3	Blau-Weiß-Selektion und Klonierung transformierter <i>Escherichia coli</i> Zellen in Flüssigkultur .....	32
2.8.4	Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	33
<b>2.9</b>	<b>Restriktionsanalyse (Testspaltung) .....</b>	<b>33</b>
<b>2.10</b>	<b>Nachweis der sekundären Endosymbionten von <i>B. tabaci</i> .....</b>	<b>34</b>
<b>2.11</b>	<b>Kontroll-PCR für WmCSV A und WmCSV B .....</b>	<b>35</b>
<b>2.12</b>	<b>Kontroll-PCR für TYLCV .....</b>	<b>36</b>
<b>2.13</b>	<b>Real-time PCR zur Quantifizierung von WmCSV und TYLCV .....</b>	<b>37</b>
2.13.1	Quantifizierung der A-Komponente von WmCSV .....	40
2.13.2	Quantifizierung der B-Komponente von WmCSV .....	41
2.13.3	Quantifizierung von TYLCV .....	41
2.13.4	Standardreihen WmCSV A und B, sowie TYLCV .....	42
2.13.5	Quantifizierung und Vergleich von A- und B-Komponente von WmCSV hinsichtlich ihres Verhältnisses .....	45
2.13.6	Quantifizierung mit DNA aus Wirtspflanzen und Weiße Fliegen .....	46
2.13.7	Quantifizierung von WmCSV A und TYLCV aus isolierten Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen .....	46
2.13.8	Relative Quantifizierung von WmCSV A und TYLCV aus Hämolymphe .....	47
<b>2.14</b>	<b>Virusaufnahme aus artifiziellm Medium .....</b>	<b>49</b>
<b>2.15</b>	<b>Menge der Virusaufnahme nach Hungerstress .....</b>	<b>51</b>
<b>2.16</b>	<b>Absolute Quantifizierung von WmCSV A und TYLCV in Individuen, Mitteldärmen und Speicheldrüsen von <i>B. tabaci</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>2.17</b>	<b>Relative Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Hämolymphe von <i>B. tabaci</i> .....</b>	<b>52</b>
<b>2.18</b>	<b>Viruskonzentration in Mitteldärmen und Hämolymphe nach Übertragen virustragender <i>B. tabaci</i> von infizierten Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen .....</b>	<b>52</b>
<b>2.19</b>	<b>Virusgehalt in Nachkommen der virustragenden Weiße Fliegen ..</b>	<b>53</b>

<b>2.20</b>	<b>Barrieren für ein nicht durch Weiße Fliegen übertragbares</b>	
	<b>Virus</b> .....	53
2.20.1	Relativer FBNSV-Gehalt in Mitteldärmen und Hämolymphe .....	54
2.20.2	Relative Quantifizierung von FBNSV in Pflanzen .....	55
<b>2.21</b>	<b>Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in <i>B. tabaci</i></b> .....	57
2.21.1	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	57
2.21.2	Lokalisierung von WmCSV und F-Aktin in Mitteldärmen .....	59
<b>2.22</b>	<b>Selektion einer nicht übertragenden <i>B. tabaci</i> Population aus</b>	
	<b>der schwach übertragenden Population 95</b> .....	61
2.22.1	TYLCV Übertragungsrate einzelner Individuen .....	61
2.22.2	TYLCV Übertragung durch Gruppen von Individuen .....	62
2.22.3	Übertragungskompetenz einzelner Individuen sowie von Gruppen in	
	Hinblick auf WmCSV .....	63
2.22.4	Verifizierung der Übertragungsrate von Population 63 und 95 .....	63
<b>2.23</b>	<b>Protein-Virus-Interaktionen</b> .....	64
2.23.1	Immunolokalisierung von Hsp70 und Ko-Immunolokalisierung	
	von Hsp70 mit WmCSV bzw. TYLCV .....	64
2.23.2	Quantifizierung von <i>hsp70</i> mRNA in virusfreien und virustragenden	
	<i>B. tabaci</i> der Population 63 und 95 .....	65
2.23.3	Fütterung von anti-Hsp70 Antikörper .....	67
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>70</b>
<b>3.1</b>	<b>Die sekundären Endosymbionten von <i>B. tabaci</i> Population 63</b>	
	<b>und 95</b> .....	70
<b>3.2</b>	<b>Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in virusinfizierten</b>	
	<b>Pflanzen und <i>B. tabaci</i></b> .....	71
3.2.1	Absolute Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in infizierten	
	symptomatischen Wirtspflanzen .....	71
3.2.2	Viruskonzentration in virustragenden <i>B. tabaci</i> .....	72
3.2.3	Virusaufnahme aus artifiziellem Medium .....	74
3.2.4	Menge der Virusaufnahme nach Hungerstress .....	75
3.2.5	Absolute Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Individuen der	
	<i>B. tabaci</i> Populationen 63 und 95 .....	76
3.2.6	Präparation von Mitteldärmen, Speicheldrüsen und Hämolymphe	
	aus <i>B. tabaci</i> .....	78

3.2.7	Absolute Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen von <i>B. tabaci</i> Population 63 und 95 .....	80
3.2.8	Relative Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus Hämolymphe ..	82
<b>3.3</b>	<b>Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in <i>B. tabaci</i> .....</b>	<b>84</b>
3.3.1	Lokalisierung in Mitteldärmen von <i>B. tabaci</i> .....	87
3.3.2	Lokalisierung von WmCSV und F-Aktin in Mitteldärmen .....	91
3.3.3	Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in Speicheldrüsen von <i>B. tabaci</i> .....	89
<b>3.4</b>	<b>Selektion einer nicht übertragenden <i>B. tabaci</i> Population aus der schwach übertragenden Population 95 .....</b>	<b>92</b>
3.4.1	Sekundäre Endosymbionten der Population 95- .....	94
3.4.2	Absolute Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Individuen, Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen der <i>B. tabaci</i> Population 95- .....	94
3.4.3	Relative Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in der Hämolymphe von <i>B. tabaci</i> Population 95- .....	95
3.4.4	Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in Population 95- .....	97
<b>3.5</b>	<b>Viruskonzentration in Mitteldärmen und Hämolymphe nach Übertragen virustragender <i>B. tabaci</i> von infizierten Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen .....</b>	<b>98</b>
<b>3.6</b>	<b>Virusgehalt in Nachkommen der virustragenden Weiße Fliegen ..</b>	<b>101</b>
<b>3.7</b>	<b>Barrieren für ein nicht durch Weiße Fliegen übertragbares Virus .....</b>	<b>103</b>
<b>3.8</b>	<b>Protein-Virus-Interaktionen .....</b>	<b>105</b>
3.8.1	Ko-Immunolokalisierung von WmCSV bzw. TYLCV mit Hsp70 .....	106
3.8.2	Quantifizierung von <i>hsp70</i> mRNA in virusfreien und virustragenden <i>B. tabaci</i> der Population 63 und 95 .....	110
3.8.3	Lokalisierung von Hsp70 und WmCSV in Population 95- .....	112
3.8.4	Fütterung von anti-Hsp70 Antikörpern .....	113
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>117</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Bemisia tabaci</i> 63 und 95 sind Populationen der kryptischen Art <i>Middle East-Asia Minor 1</i> .....</b>	<b>117</b>
<b>4.2</b>	<b>Unterschiedliche Transmissionsraten von <i>B. tabaci</i> 63 und 95 ....</b>	<b>117</b>
<b>4.3</b>	<b>Endosymbionten sind nicht für die Effizienz der Virusübertragung durch <i>B. tabaci</i> verantwortlich .....</b>	<b>118</b>



4.4	Die Aufnahme von WmCSV und TYLCV aus artifiziellem Medium führt zu gleichen Konzentrationen in <i>B. tabaci</i> Population 63 .....	120
4.5	Die unterschiedlichen Virusmengen zwischen Population 63 und 95 sind nicht auf ein unterschiedliches Saugverhalten zurückzuführen .....	121
4.6	Selektion einer nicht übertragenden <i>B. tabaci</i> Population aus der schwach übertragenden Population 95 .....	123
4.7	Quantifizierung und Lokalisierung von WmCSV und TYLCV und ihre Barrieren in Population 95 und 95- .....	123
4.8	Nach Isolation von infizierten Wirtspflanzen, nimmt der Virusgehalt von <i>B. tabaci</i> über einen Zeitraum von 10 Tagen kaum ab .....	134
4.9	Begomoviren lassen sich in Nachkommen von virustragenden <i>B. tabaci</i> nachweisen .....	135
4.10	Interaktion der viralen Hüllproteine mit Hsp70, jedoch keine Förderung der Übertragung .....	136
<b>5 Zusammenfassung .....</b>		<b>139</b>
•	Abstract .....	140
<b>6 Anhang .....</b>		<b>141</b>
6.1	Nukleinsäure-Extraktionen aus Weiße Fliegen und Wirtspflanzen .....	141
6.2	Speziesbestimmung durch Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom-Oxidase I (mtCOI) Gens .....	147
6.3	Standardreihen und Standardkurven zur Quantifizierung von WmCSV und TYLCV .....	148
6.4	DNA-Gehalt pro einem durchschnittlichen Individuum <i>B. tabaci</i> ..	156
6.5	Selektion einer nicht übertragenden <i>B. tabaci</i> Population aus der schwach übertragenden Population 95 .....	157
6.6	Tabellen zu Quantifizierungsdaten .....	158
6.7	Quantifizierung von <i>hsp70</i> mRNA in virusfreien und virustragenden <i>B. tabaci</i> der Population 63 und 95 .....	163
6.8	Relative Quantifizierung von FBNSV in Pflanzen .....	164

<b>6.9</b>	<b>Größenstandards .....</b>	<b>166</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>167</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>183</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf des Autors</b>	<b>185</b>

## Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde vom August 2008 bis März 2012 in der Abteilung Pflanzenviren der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stephan Winter für die Vergabe des interessanten Themas, seine Betreuung, seine Unterstützung und Diskussionsbereitschaft und für die vielen Ratschläge.

Ebenfalls besonders bedanke ich mich bei Frau Dr. Monika Götz, für die vielen Ideen, ihren zeitlichen Aufwand, ihre Hilfe und ihre engagierte Mitwirkung u.a. am konfokalen Mikroskop und nicht zuletzt für ihre konstruktive Kritik.

Großen Dank gebührt Frau Sabine Bonse für ihre Unterstützung beim Durchführen der unzähligen *real-time* PCR Versuche.

Bei Frau Beate Stein bedanke ich mich für die Hilfe im Gewächshaus und am Binokular.

Frau Vera Bicknäse danke ich für ihre Hilfe im Gewächshaus, besonders für die Bereitstellung der vielen Pflanzen.

Frau Agnes Pietruzka danke ich für die Durchführung von Virusextraktionen und Bereitstellung von kompetenten Zellen.

Nicht minder danke ich herzlich meinen weiteren äußerst netten und hilfsbereiten Kolleginnen und Kollegen, Marianne (Nanni) Koerbler, Anja Butgereitt, Lara Lintl, Ute Zender, Marion Liebrecht und Dr. Wulf Menzel, für die vielen interessanten, unterstützenden und unterhaltsamen Gespräche.

Allen Mitarbeitern des JKI Braunschweig danke ich für die angenehme, kollegiale und freundliche Arbeitsatmosphäre, die bedeutend zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen hat.

Bei Herrn Prof. Dr. Dieter Jahn bedanke ich mich für sein Mentoring.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Hehl danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. Ralf-Rainer Mendel bedanke ich mich für die Übernahme des Kommissionsvorsitzes.

Ganz besonderer Dank gebührt meinen Eltern und Batuly für ihre Unterstützung.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAP	<i>acquisition access period</i> (Zeitraum des Erwerbs)
Abb.	Abbildung
<i>B. t.</i>	<i>B. tabaci</i> / <i>Bemisia tabaci</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
c	Konzentration
ca.	<i>circa</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNS)
CP	<i>coat protein, capsid protein</i> (Hüllprotein)
Cq	<i>cycle of quantification</i> (Zyklus der Quantifizierung, Schwellenwert-Zyklus)
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cy3	Cyanin 3
d	<i>day</i> (Tag)
d.h.	das heißt
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DPG	Deutsche Phytomedizinische Gesellschaft e.V.
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alii, et aliae</i> (und andere)
FBNSV	<i>Faba bean necrotic stunt virus</i>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>

G	Guanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GIF	<i>German-Israeli Foundation for Scientific Research and Development</i> (Deutsch-Israelische Stiftung für wissenschaftliche Forschung und Entwicklung)
H	Wasserstoff
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Hsp	<i>heat shock protein</i> (Hitzeschockprotein)
IAP	<i>inoculation access period</i> (Übertragungszeit)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	<i>intergenic region</i> (auch als <i>common region</i> bezeichnet)
JKI	Julius Kühn Institut
LB	Luria Bertani
M	Molare Masse
m	Masse
Mbp	Megabasenpaare
MES	2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfon-säure
min	Minuten
μl	Mikroliter
mol	Einheitszeichen für die Stoffmenge Mol
mol/l	Stoffmengenkonzentration, Molarität
MP	<i>movement protein</i>
MS	Murashige und Skoog
mtCOI	mitochondriale Cytochrom-Oxidase I
N	Gesamtanzahl von Versuchen (Wiederholungen + Parallelen)
N	Normalität, Normal
n	Anzahl von Parallelen
ng	Nanogram
nm	Nanometer
NSP	<i>nuclear shuttle protein</i> (Kerntransportprotein)
nt	Nukleotid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	optische Dichte
ORI	<i>origin of replication</i> (Startpunkt der Replikation)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
R	Purine

rDNA	ribosomale DNA
rec.	recombinant
Rep	<i>replication-associated protein</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur (zwischen 20 °C und 25 °C)
S	Svedberg'scher Sedimentationskoeffizient
s	Sekunde
s.	siehe
SCAR	<i>sequence characterized amplified regions</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SOB	<i>super optimal broth</i>
spec.	<i>species</i> (Art)
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> (einzelfsträngige DNS)
ssp	Subspezies/Sorte
T	Thymin
t	<i>t</i> -Wert; das Ergebnis eines statistischen Signifikanztests
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan / 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
TYLCD	<i>Tomato yellow leaf curl disease</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
USD	<i>United States Dollar</i> (Währungseinheit der USA)
USA	<i>United States of America</i> (Vereinigte Staaten von Amerika)
UV	Ultra-Violett
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit
VOPBA	<i>Virus overlay protein binding assay</i> (Bindungsnachweis zwischen Virus und Proteinen durch Überlagerung)
w/v	<i>weight/volume</i> (Gewichtseinheit pro Volumeneinheit)
WmCSV	<i>Watermelon chlorotic stunt virus</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y	Pyrimidine
YEB	<i>yeast extract buffered</i>

Griechische Buchstaben und Symbole

$\alpha$	alpha, Fehler 1. Art
$\beta$	beta
$\Delta$	Delta, Differenz
$\lambda$	lambda, Wellenlänge elektromagnetischer Strahlung
%	Prozent
$\approx$	gerundet
*	Signifikanz zwischen quantifizierten Werten
&	und
$\infty$	unendlich

## 1 Einleitung

Viruskrankheiten stellen weltweit eine große Bedrohung für den Anbau der für unsere Ernährung wichtigen Kulturpflanzen dar. Von besonderem Maße sind Pflanzen in tropischen und subtropischen Regionen betroffen, weil hier ideale klimatische Bedingungen für die virusübertragenden Insekten bestehen, die Viren und Viruskrankheiten verbreiten. Virusübertragende Insekten (Vektoren) werden mit den globalen Warenströmen besonders mit Pflanzgut und Schnittblumen weltweit verschleppt und etablieren sich vor allem dort, wo klimatische Bedingungen die Entwicklung von Insektenpopulationen begünstigen und ein Überleben auch in kalten oder trockenen Zeiten möglich ist. Mit den Insekten treten spezifische Viruskrankheiten auf und wenn sich der Kreis von Wirtspflanzen für Insekten mit dem der Viren deckt, werden Viren rasch verbreitet.

Die durch die Pflanzenviren der Gattung *Begomovirus*, besonders bei Tomaten (*Solanum lycopersicum*) und Gurkengewächse (*Cucurbitaceae*) hervorgerufenen Krankheiten, sind aufgrund ihrer hohen Ertragseinbußen die ökonomisch bedeutendsten Pflanzenkrankheiten der Welt (FAOSTAT, 2012, FAO Statistics Division, Rom, Italien; Anderson und Morales, 2005; Lapidot und Friedmann, 2002).

Tomaten werden in nahezu allen Regionen der Welt im Freiland angebaut. Dort wo die klimatischen Bedingungen den Feldanbau nicht möglich machen, dienen Gewächshäuser dazu, ideale Wachstumsbedingungen für diese wichtigen Gemüsepflanzen zu schaffen. Besondere Schädlinge, die in nahezu allen Tomatenanbaugebieten der Welt vorkommen, sind Weiße Fliege Insekten der Art *Bemisia tabaci*, die vor allem deshalb eine besondere Gefahr darstellen, weil sie die Vektoren von Viren der Gattung *Begomovirus* sind. Das *Begomovirus Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) ist eines der weltweit bedeutendsten Pflanzenviren und die durch dieses Virus hervorgerufene Krankheit, die *Tomato yellow leaf curl disease* (TYLCD) führt in allen Anbauregionen der Welt zu großen Ernteverlusten (Cohen und Nitzany, 1966; Pico *et al.*, 1996; Ghanim und Czosnek, 2000; Czosnek *et al.*, 2002, Lefeuvre *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2012a).

Seit den 80er Jahren des 20sten Jahrhunderts hat sich TYLCD schnell im Mittleren Osten und im Süden Europas, in Asien und in Afrika, sowie in Amerika und Australien ausgebreitet (Rochester *et al.*, 1990; Brown und Bird, 1992; Czosnek und Laterrot, 1997; Moriones und Navas-Castillo, 2000; Tesoriero und Azzopardi, 2006; Fazeli *et al.*, 2009; Papayiannis *et al.*, 2010). Die Krankheit wird von einem Komplex phylogenetisch eng verwandter jedoch genetisch distinkter Viren ausgelöst, von denen bislang mehr als 60 *Begomovirus*arten weltweit in TYLCD befallenen Pflanzen beschrieben wurden.



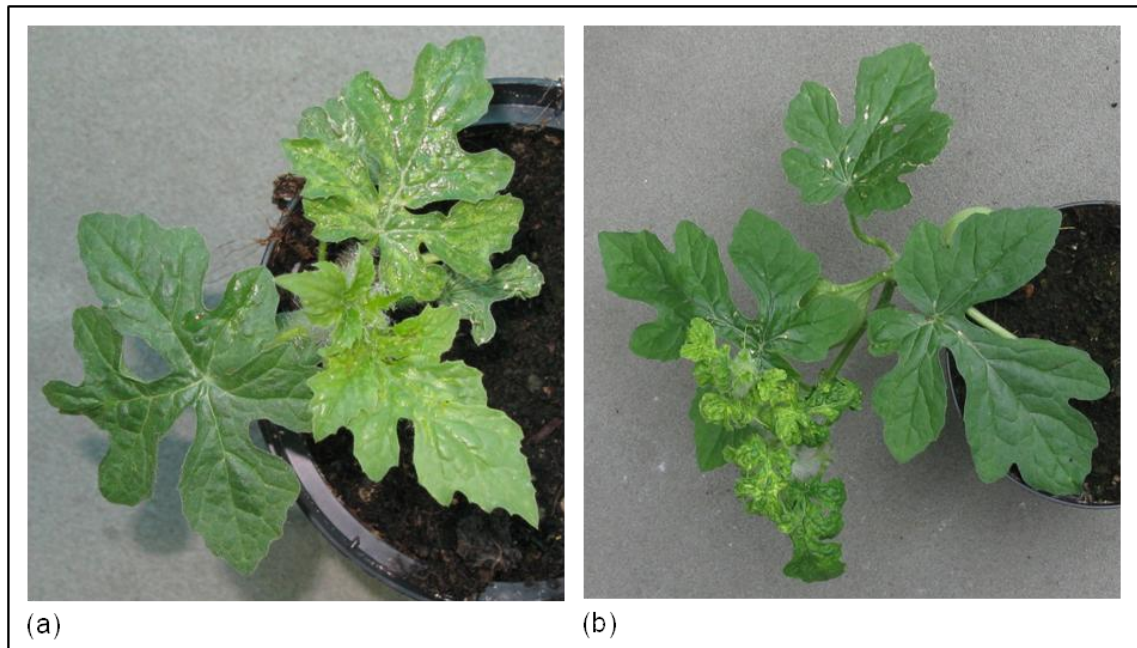
Die meisten dieser Viren haben monopartite Genome, jedoch kommen auch bipartite Viren, mit DNA A und DNA B Genomkomponenten, vor. Die Krankheitssymptome sind für alle Viren und für alle Tomatengenotypen nahezu identisch. Bei jungen Pflanzen werden Symptome circa 14 Tage bis drei Wochen nach Inokulation sichtbar (Abb. 1.1). Typische TYLCD Symptome sind besonders in den jungen sich entfaltenden Blättern sichtbar, die stark gekräuselt, deformiert und auch oft chlorotisch verfärbt sind. Frühinfektionen führen zu starken Wuchsstauchungen und zu Blütenabwurf, so dass TYLCV infizierte Pflanzen entweder keine oder lediglich kleine, nicht vermarktbar Früchte hervorbringen (Rochester *et al.*, 1990; Kheyr-Pour *et al.*, 1991; Czosnek und Laterrot, 1997; Diaz-Pendón *et al.*, 2010; Luna *et al.*, 2012).



**Abbildung 1.1: Gesunde und mit TYLCV infizierte junge Tomatenpflanzen der Sorte 'Linda'.** (a) Obere vier Blätter einer gesunden Tomatenpflanze. (b) Obere vier Blätter einer symptomatischen Tomatenpflanze, vier Wochen nach Infektion mit TYLCV.

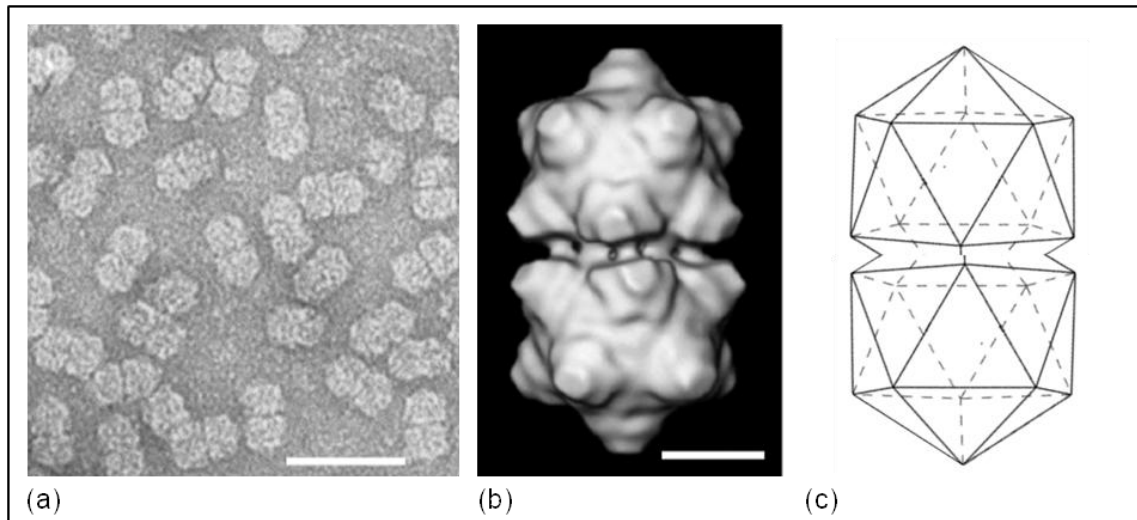
Auch *Cucurbitaceen* werden von *B. tabaci* übertragenen Begomoviren stark geschädigt. Seit den 1970er Jahren wird vor allem in den Ländern Nordafrikas und der arabischen Welt Asiens die Wassermelonenproduktion durch das Begomovirus *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) beeinträchtigt (Jones *et al.*, 1988; Bedford *et al.*, 1994; Kheyr-Pour *et al.*, 2000; Bananej *et al.*, 2002; Sufrin-Ringwald und Lapidot, 2011; Al-Musa *et al.*, 2011, Khan *et al.*, 2012). Lokal und saisonal wurden bis zu 80 % Ernteeinbußen an Wassermelonen (*Citrullus lanatus*) durch WmCSV festgestellt. Auch totale Ernteaussfälle sind nicht selten (Lecoq *et al.*, 2003, Anderson und Morales, 2005). Im Jemen, wo die durch WmCSV ausgelöste Krankheit (*Watermelon chlorotic stunt disease*, WmCSD) im Jahr 1986 zum ersten Mal wissenschaftlich beschrieben wurde, waren über 90 % der angebauten Wassermelonen infiziert, worauf drastische Ertragseinbußen folgten (Jones *et al.*, 1988). Abbildung 1.2 zeigt eine junge gesunde

und eine junge mit WmCSV infizierte symptomatische Wassermelonpflanze. Zu den typischen Symptomen der WmCSD gehören, chlorotische Fleckenbildung und Gelbfärbung der Blattadern, Wuchsstauchung und Kräuselung junger Blätter. Bei infizierten Pflanzen ist die Zahl der gebildeten Früchte stark reduziert und ähnlich der TYLCD unterbleibt bei Frühinfektion die Fruchtbildung (Jones *et al.*, 1988; Bedford *et al.*, 1994; Kheyr-Pour *et al.*, 1997; Bananej *et al.*, 2002).



**Abbildung 1.2: Gesunde und mit WmCSV infizierte Wassermelonen der Sorte 'Sugarbaby'.** (a) Gesunde junge Wassermelonpflanze. (b) Symptomatische junge Wassermelonpflanze vier Wochen nach Inokulation mit WmCSV. Schwere Verkräuselung der jüngsten Blätter und chlorotische Verfärbung sind deutliche Symptome von WmCSD. Ältere Blätter bleiben meist symptomlos.

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Begomoviren, das WmCSV und das TYLCV untersucht. Sie gehören zur Familie *Geminiviridae*. Das Genom dieser Viren besteht aus einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (*single stranded DNA*, ssDNA), die in Hüllproteinpartikel verpackt ist. Die Partikel bestehen aus zwei identischen Ikosaedern, die den Viren das namensgebende zwillingshafte Aussehen verleihen (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3: Geminiviren.** (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Geminiviren (*Maize streak virus*, Gattung *Mastrevirus*) mit der charakteristischen Zwillings-Morphologie. Der Balken repräsentiert eine Länge von 100 nm (modifiziert, aus Briddon und Stanley, 2009). (b) Dreidimensionale Rekonstruktion eines *Maize streak virus* Partikels. Der Balken repräsentiert eine Länge von 10 nm (aus Zhang *et al.*, 2001). (c) Geometrisches Modell einer Gemini-Struktur, bestehend aus zwei verbundenen unvollständigen Ikosaedern.

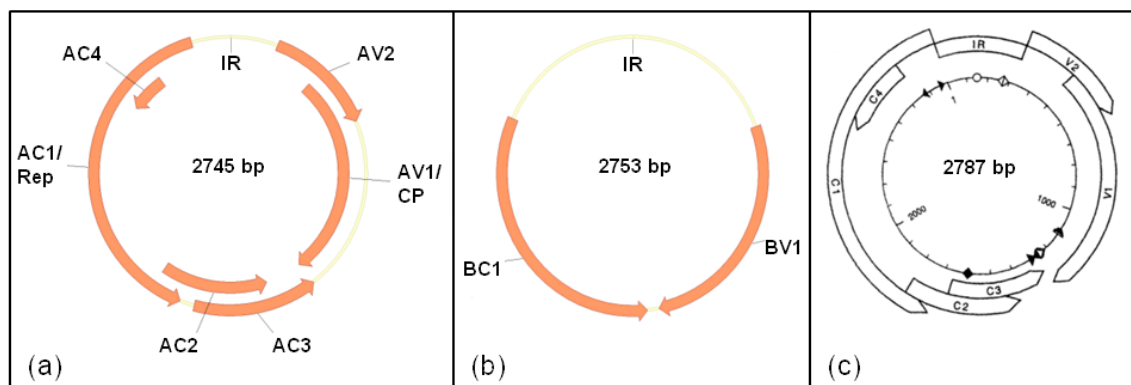
Geminiviren gehören mit einer Partikelgröße von 22 nm x 38 nm und einem Genom von nur ca. 2700 Nukleotiden zu den kleinsten Pflanzenviren (Goodman, 1977; Francki *et al.*, 1980; Stanley *et al.*, 1986; Czosnek *et al.*, 2002; Hull, 2004; Böttcher *et al.*, 2004; Blanc *et al.*, 2011).

Abbildung 1.4 (a, b) zeigt schematisch das Genom von WmCSV. Das WmCSV besitzt ein bipartites Genom, bestehend aus den ssDNA Komponenten DNA A und DNA B. Auf der Genomkomponente DNA A sind zwei Gene in Leserichtung (AV1, AV2) und vier Gene in komplementärer Richtung kodiert (AC1 bis AC4). Eine intergenische Sequenz (*common region*, *intergenic region*, IR) enthält den Replikationsstart (*origin of replication*, ORI). Die Replikation findet durch doppelsträngige Replikationsintermediate in einem sogenannten *rolling-circle* Mechanismus statt. Die Synthese von komplementärer DNA am viralen ssDNA Strang erfolgt ausschließlich durch Wirtsfaktoren und wird durch das virale replikationsassoziierte Protein (Rep) initiiert.

Das AV1-Genprodukt ist das Hüllprotein (*coat protein*, *capsid protein*, CP) des Virus und das einzige Strukturprotein. Das AC1-Genprodukt ist das Rep, welches sequenzspezifisch an die DNA des Virus bindet und in der intergenischen Region, in einer für alle Geminiviren absolut konservierten Sequenz TAATATT/AC, in der Schleife der Haarnadelstruktur, die ssDNA schneidet und die Replikation einleitet (Elmer *et al.*, 1988; Fontes *et al.*, 1992, 1994a, b; Hoogstraten *et al.*, 1996; Galvão *et al.*, 2003). Das Protein AV2 besitzt eine Protein-Kinase-Funktion und ist involviert in den Virustransport in Nachbarzellen (Mubin *et al.*, 2007; Chowda-Reddy *et al.*, 2008). AC2 ist ein

Transaktivierungsfaktor, der für die effiziente Expression von *AV1* und *BV1* benötigt wird und Funktionen bei der RNAi-Unterdrückung hat (Sunter und Bisaro, 1992, Rahman *et al.*, 2012). *AC3* steigert die Akkumulation der viralen DNA und hat auch eine Rolle als Replikationsverstärker (Sunter *et al.*, 1990; Galvão *et al.*, 2003). *AC4* ist ein kleines Protein, welches unter anderem für Membranbindungen erforderlich ist und bei bestimmten Viren auch RNA *silencing* Prozesse als pflanzliche Immunreaktion unterdrückt (Pooma und Petty, 1996; Fondong *et al.*, 2007).

Auf der DNA B sind zwei Gene kodiert, das *BV1* in Leserichtung kodiert für ein *nuclear shuttle protein* (NSP); das *BC1* in komplementärer Richtung ist das Gen für das *viral movement protein* (MP). Die Intergensequenz der DNA B ist der Intergensequenz der DNA A identisch. Beide weisen die typischen invertierten komplementären Sequenzen auf, die zur Bildung einer Haarnadelstruktur notwendig sind. Das NSP regelt den Transport der viralen DNA vom Zellkern in das Zytoplasma. Das *BC1*-Genprodukt hat eine Funktion als Transportprotein (MP), welches zur Vergrößerung von Plasmodesmen führt und somit den Zell zu Zell Transport unterstützt (Sanderfoot und Lazarowitz, 1996; Sinisterra *et al.*, 2005; Wege und Pohl, 2007; Zhou *et al.*, 2007).



**Abbildung 1.4: Schematische Genomstruktur von WmCSV und TYLCV.** (a) WmCSV Genomkomponente DNA A mit sechs kodierten Genen. (b) WmCSV Genomkomponente DNA B mit zwei kodierten Genen. Erstellt mit *Vector NTI* (Invitrogen). (c) TYLCV Genom mit sechs kodierten Genen (nach Navot *et al.*, 1991). bp: Basenpaar, CP: *coat protein* (Hüllprotein), IR: *intergenic region* (Intergensequenz), Rep: *replication-associated protein* (Replikationsassoziiertes Protein).

Im Gegensatz zu WmCSV besteht das Genom von TYLCV aus einer zirkulären ssDNA (monopartit), auf dem sechs Gene codiert sind. Zwei sind direkt in Leserichtung auf dem Strang des Genoms kodiert (*V1*, *V2*) und vier sind in komplementärer Richtung angeordnet (*C1* bis *C4*). Auch hier ist eine Intergensequenz (IR), in der sich die konservierte TAATATT/ACC Sequenz befindet, vorhanden. Obwohl sich die Genomstruktur von der des bipartiten WmCSV unterscheidet, sind sowohl die Anordnung der Gene als auch die Gensequenzen sehr ähnlich (Kheyr-Pour *et al.*,

1991; Navot *et al.*, 1991, Antignus und Cohen, 1994; Idris und Brown, 2005). Abbildung 1.4 (c) zeigt den schematischen Aufbau des Genoms von TYLCV. V1 enthält die Sequenz für das Hüllprotein. V2 ist ein *movement protein* und wirkt auch als Unterdrücker von *RNA silencing* (Wartig *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 2001; Yaakov *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). C1 kodiert für ein Rep, welches für die Replikation des Virus in den Wirtszellen notwendig ist (Laufs *et al.*, 1995; Behjatnia *et al.*, 1998; Noris *et al.*, 1996a; Fuentes *et al.*, 2006). C2 und C3 sind Enhancer, die die Replikation beschleunigen. C4 ist ebenfalls ein *movement protein* und hat auch Einfluss auf die Schwere von Symptomen, sowie auf die Vielfalt der Wirtspflanzen (Jupin *et al.*, 1994, Noris *et al.*, 1996b, Sinisterra *et al.*, 2005; Bisaro, 2006, Peretz *et al.*, 2011, Tomás *et al.*, 2011).

### Geminiviren und ihre Vektoren

WmCSV und TYLCV verbreiten sich wie alle Geminiviren systemisch in der Wirtspflanze, gelangen über die Plasmodesmen von Zelle zu Zelle und werden im Phloem über große Strecken transportiert. Als obligate Pathogene sind Viren an lebende Pflanzen gebunden und müssen zur Erhaltung der Art und zur Verbreitung auf andere Pflanzen übertragen werden. Weil Virusinfektionen nur durch Verwundung entstehen können und Viren in lebende Zellen eingebracht werden müssen, spielen in der Natur für die Verbreitung der Viren vor allem beißende und saugende Insekten eine große Rolle. Als Virusvektoren können auch pflanzenpathogene Pilze, Nematoden oder Milben in Frage kommen, die Virusübertragung durch Insekten ist die bedeutendste Art der Verbreitung von Pflanzenviren (Aaziz *et al.*, 2001; Briddon und Stanley, 2009).

Viren haben nicht nur spezifische Wirtspflanzen, sondern müssen mit ihren Vektoren besondere Interaktionen eingehen, um effizient übertragen zu werden. So sind Viren bestimmter Gattungen auch an besondere Vektoren gebunden von denen sie ausschließlich übertragen werden. Die Vektoren der Poty- oder der Poleroviren sind bestimmte Blattlausarten. Nepoviren werden von Nematoden übertragen und für Begomoviren kommen ausschließlich Weiße Fliegen, *B. tabaci*, zur Verbreitung in Frage (Hull, 2004). Die Viren gelangen mit der Aufnahme des Pflanzensafts in den Körper der Insekten. Bei der nicht-zirkulativen Übertragung haften sie spezifisch am Mundstachel (Stilet) und werden bei der weiteren Saugtätigkeit, zur Infektion von neuen Geweben und Pflanzen, wieder abgegeben. 50 % der bekannten von Insekten übertragenden Pflanzenviren werden jedoch zirkulativ übertragen. Dabei gelangen die Viren zunächst über die Nahrung in den Organismus des Insekts. Anschließend

werden sie von der Hämolymphe zu den Speicheldrüsen transportiert und mit dem Speichel wieder reinfiziert und in eine neue Wirtspflanze übertragen. Sollten sich die Viren auf ihrem Weg durch den Vektor replizieren, dann wird der Vorgang als „zirkulativ-propagativ“ bezeichnet (Fereres und Moreno, 2009; Blanc *et al.*, 2011).

Die Viren der Familie *Geminiviridae* werden von Insekten übertragen und nach Art der Vektoren, sowie nach ihrer Genomorganisation in vier Gattungen unterteilt: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocuvirus* und *Begomovirus*. Während die Genome von Viren der Gattungen *Mastrevirus* und *Curtovirus* aus jeweils einer Komponente von ssDNA bestehen und sie von Zikaden „zirkulativ nicht-propagativ“ übertragen werden, so wird die Gattung *Topocuvirus*, ausschließlich von der Buckelzikade *Micrutalis malleifera* übertragen und die Gattung *Begomovirus*, deren Mitglieder monopartite und bipartite Genome aufweisen, wird durch Weiße Fliegen übertragen (Power, 2000; Hull, 2004; Blanc *et al.*, 2011).

Begomoviren bilden eine der größten und erfolgreichsten Gruppe von Pflanzenviren. Sie kommen besonders in den tropischen und subtropischen Regionen der Erde vor und ihre Pflanzeninfektionen führen zu schweren Ertragsausfällen gerade bei Kulturpflanzen, die der menschlichen Ernährung dienen (Simone *et al.*, 1990; Brown und Bird, 1992; Polston und Anderson, 1997; Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000; Moriones und Navas-Castillo, 2000; Ambrozevicius *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003).

Begomoviruspartikel haben eine Größe von 22 nm x 38 nm (Czosnek *et al.*, 2002). Die Genome sind in besondere Zwillingpartikel verpackt, je ein Molekül DNA A oder DNA B in ein Virion (Abb. 1.3), das durch das Hüllprotein (CP) gebildet wird. Das CP der Begomoviren ist ein multifunktionales Protein, das neben der Struktur auch für Vektorspezifität und Vektorübertragung durch *B. tabaci* verantwortlich ist (Briddon *et al.*, 1990; Azzam *et al.*, 1994; Caciagli *et al.*, 2009). So führte der Austausch des Hüllproteins eines nicht Vektor-übertragbaren *Abutilon mosaic virus* (AbMV), gegen das Hüllprotein von *Sida golden mosaic virus* (SiGMV) dazu, dass die AbMV-SiGMV-Chimäre durch *B. tabaci* effizient übertragen wurde (Höfer *et al.*, 1997). Der Austausch von lediglich zwei Aminosäuren im Hüllprotein des AbMV restaurierte die Vektorübertragung (Höhnle *et al.*, 2001). Ebenfalls im Hüllproteingen des WmCSV wurde eine Region identifiziert (Aminosäuren 131-133), die die Übertragung des Virus durch *B. tabaci* bestimmt (Kheyr-Pour *et al.*, 2000).

Weiße Fliegen, *B. tabaci*, die den deutschen Namen Tabakmottenschildläuse tragen, gehören zur Familie der Mottenschildläuse (*Aleyroidae*), zu der mehr als 1200 Insektenarten gezählt werden. Mottenschildläuse gehören taxonomisch zur Ordnung der *Hemiptera* (Schnabelkerfen), die sich allesamt stechend saugend vom Pflanzensaft

des Phloems ihrer Wirte ernähren (Fauna Europaea, Stichwort Hemiptera, [http://www.faunaeur.org/full\\_results.php?id=12353](http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=12353)). *B. tabaci* wurde erstmals 1889 in Griechenland von Gennadius als Tabakschädling wissenschaftlich beschrieben. Annähernd ein Jahrhundert später waren weltweit bereits über 600 Wirtspflanzenspezies registriert. Gleichzeitig wurde die schnelle Anpassungsfähigkeit an neue Wirte und die weite Verbreitung von *B. tabaci* beschrieben (Gennadius, 1889; Greathead, 1986; Byrne und Bellows, 1991; Gunning *et al.*, 1995; Martin *et al.*, 2000; Muñiz, 2000).

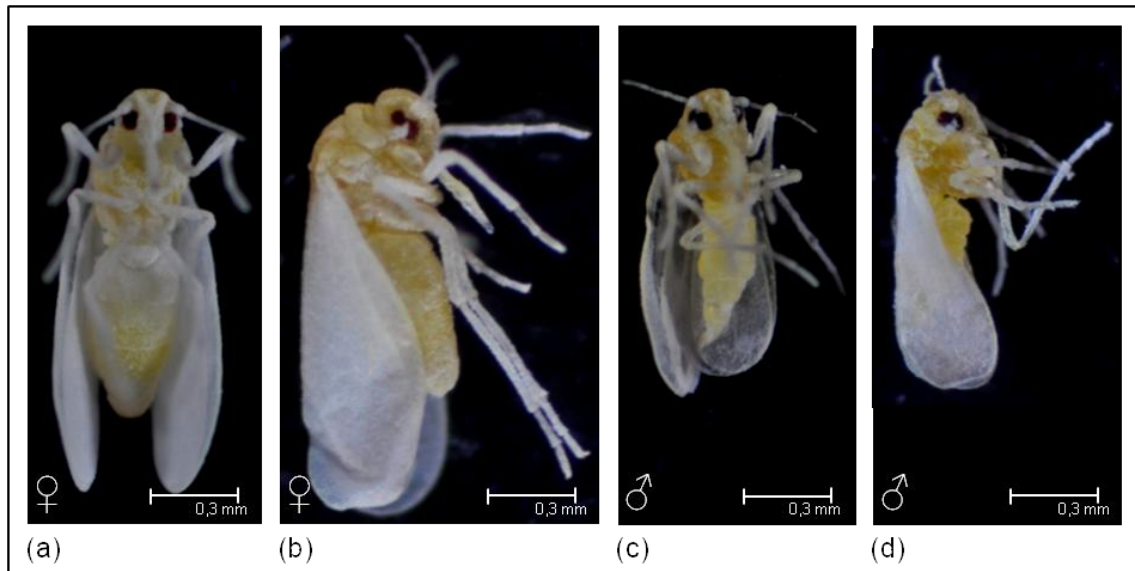
Anfangs wurde *B. tabaci* lediglich als ein Schädling mit untergeordneter Relevanz angesehen (Bird, 1957; Bird und Maramorosch, 1975; Wool *et al.*, 1994). Doch seit Anfang der 1980er Jahre genießt *B. tabaci* als Schädling von Kulturpflanzen in allen tropischen und subtropischen, sowie auch in den Gewächshäusern der gemäßigten Regionen der Erde, besondere Aufmerksamkeit. Dies beruht zum einen auf der polyphagen Ernährungsweise, den Vektoreigenschaften bei der Übertragung von Begomoviren auf Nutzpflanzen und dem damit verbundenen großen ökonomischen Schaden, sowie zum anderen auf der Zunahme an Resistenzen gegen Insektizide (Dittrich *et al.*, 1985; Cock, 1986; Gonzalez *et al.*, 1992; Brown und Bird, 1992; Costa *et al.*, 1993; Coats *et al.*, 1994; Markham *et al.*, 1994; Brown und Czosnek, 2002; Roditakis *et al.*, 2005; Thompson, 2011; Liu *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2009; Crowder *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2012; McKenzie *et al.*, 2012).

Im Jahre 1995 wurde zwischen 16 verschiedenen Biotypen unterschieden (Brown *et al.*, 1995b) und im Jahre 2001 bereits zwischen mehr als 20. Morphologisch ließen sich die verschiedenen Biotypen und Populationen nicht voneinander unterscheiden. Daher wurden sie hauptsächlich nach Verhalten, der Spezifität der Übertragung bestimmter Begomoviren und aufgrund der von molekularen Unterschieden, vor allem in mitochondrialen Gensequenzen, differenziert (Bird und Maramorosch, 1978; Perring *et al.*, 1993; Bedford *et al.*, 1994; Rosell *et al.*, 1997; De Barro *et al.*, 1998, 2000, 2003, 2005; Frohlich *et al.*, 1999; Perring, 2001; Viscarret *et al.*, 2003; Berry *et al.*, 2004; De Barro, 2005; Sseruwagi *et al.*, 2005; Brown, 2007a, b).

Seit einigen Jahren wird die Unterteilung der *B. tabaci* in Biotypen durch ein Artenkonzept ersetzt, dass *B. tabaci* als Komplex von mindestens 11 phylogenetischen Gruppen mit nun 34 morphologisch nicht unterscheidbaren, kryptischen Arten definiert. Die Arten können nun quantitativ mittels der Gensequenzen mitochondrialer Cytochrom-Oxidase I Gene differenziert werden (Dinsdale *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; De Barro *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; Alemandri *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; Tay *et al.*, 2012). Die von Gennadius ursprünglich beschriebene *B. tabaci* wurde der Art *B. tabaci Mediterranean* zugeordnet (Tay *et al.*, 2012).



Der Körper eines adulten *B. tabaci* Weibchens hat eine Länge von etwa einem Millimeter. Die Individuen, die von extra-kutikularen Wachsen bedeckt sind, weisen einen Geschlechtsdimorphismus auf, wobei die Männchen etwas kleiner sind und eine andere Abdomenform besitzen (Abb. 1.5).



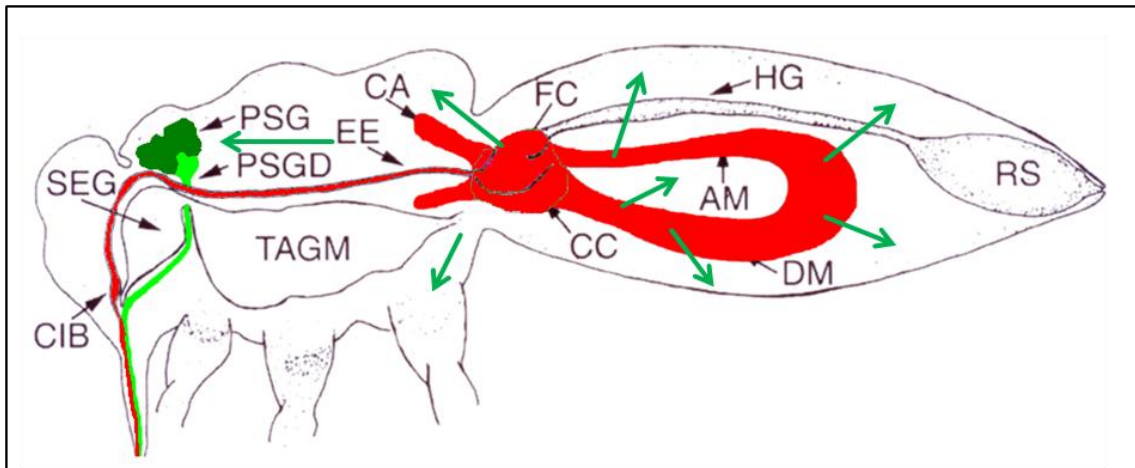
**Abbildung 1.5: *B. tabaci* MEAM1 Population 63 aus dem Sudan.** (a) Adultes Weibchen in ventraler Ansicht. (b) Adultes Weibchen in Seitenansicht. (c) Adultes Männchen in ventraler Ansicht. (d) Adultes Männchen in Seitenansicht.

Ihr Lebenszyklus besteht aus den folgenden sechs Stadien: Aus den Eiern schlüpft die erste bewegliche Larve, aus der sich zwei mittlere Larvenstadien entwickeln, wovon sich das letztere zur Puppe entwickelt, aus der das adulte geschlechtsreife Vollinsekt (Imago) schlüpft (Byrne und Bellows, 1991).

Alle Individuen von *B. tabaci* sind von obligaten primären Endosymbionten besiedelt, dem Gram-negativen, stäbchenförmigen, nicht kultivierbaren  $\gamma$ -Proteobakterium *Candidatus Portiera aleyrodidarum*, das in spezialisierten Zellen, den Bakteriozyten, lebt. Diese Zellen sind in Strukturen, genannt Bakteriome, organisiert (Baumann *et al.*, 2004; Thao und Baumann, 2004b). Neben den primären Endosymbionten sind auch mehrere fakultative sekundäre prokaryotische Endosymbionten bekannt. Diese sind *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, *Cardinium*, *Fritschea*, *Rickettsia* und *Wolbachia* (Chiel *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2012b, c). Im Jahr 2012 wurden von Singh *et al.* in Indien, für Arten der *B. tabaci* *Asia I* und *Asia II* weitere Endosymbionten der Gattungen *Bacillus*, *Enterobacter*, *Paracoccus* und *Acinetobacter* beschrieben.



Alle *B. tabaci* Arten übertragen Pflanzenviren, sie unterscheiden sich jedoch in der spezifischen Übertragungsfähigkeit für bestimmte Viren (Brown *et al.*, 1995b; Perring, 2001). So ist beispielsweise in China die Aufnahme- und Übertragungsfähigkeit von TYLCV durch die *B. tabaci Mediterranean* effizienter als die der kryptischen Art *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1) (Pan *et al.*, 2012a). Obwohl auch die Larvenstadien von *B. tabaci* in der Lage sind Begomoviren zu übertragen, erfolgt die Verbreitung der Viren durch die flugfähigen adulten Tiere. Nach Transfer von adulten Insekten von virusfreien Pflanzen auf infizierte Pflanzen, wurde beispielsweise für TYLCV eine Aufnahmezeit (*acquisition access period*, AAP) von 5 bis 10 Minuten bestimmt. Die Zeitspanne, die nach Transfer von der Virusquelle auf eine gesunde Wirtspflanze, bis zur Infektion der neuen Wirtspflanze verstrich, betrug ebenfalls nur 5 Minuten, was darauf hindeutet, dass die Insekten sofort nach ihrem Transfer zu saugen beginnen. Die Zeitspanne zwischen Virusaufnahme und –abgabe durch ein einzelnes Insekt, inklusive Infektion der Wirtspflanze, wurde mit 24 Stunden ermittelt (Cohen und Nitzany, 1966; Mehta *et al.*, 1994; Caciagli *et al.*, 1995; Czosnek *et al.*, 2002). Das zeigt eine sehr schnelle Translokation der Viren in den Vektorinsekten. Bei der zirkulativen Übertragung der Begomoviren durch *B. tabaci*, müssen die Viren verschiedene Barrieren innerhalb der Insekten überwinden, nachdem sie mittels Stilett aus dem Phloem der Wirtspflanzen aufgenommen und über die Speiseröhre in den Verdauungstrakt gelangt sind. Als Barrieren werden die äußere und innere Membran des Mitteldarms, die Hämolymphe und die Membranen der Speicheldrüsen diskutiert. Sind diese Barrieren überwunden, werden die Viren über den Speichelkanal in die Wirtspflanzen injiziert (Hunter *et al.*, 1998; Ghanim und Czosnek, 2000; Czosnek *et al.*, 2002). Abbildung 1.6 zeigt eine Skizze von *B. tabaci* mit dem zirkulativen Weg der Begomoviren.



**Abbildung 1.6: Schema der zirkulativen Übertragung von Begomoviren durch *B. tabaci*.**

In rot eingezeichnet der Weg der Viren von der Wirtspflanze über das Stilett in dem Mitteldarm. Mit grünen Pfeilen ist der Übergang vom Mitteldarm in das Hämocoel, sowie die Verteilung im Organismus mittels Hämolymphe dargestellt. In grün ist der Weg der Viren über Speicheldrüsen, Speichelkanal und Stilett zurück in die Wirtspflanze markiert. Skizze aus Ghanim *et al.*, 2001b, für diese Arbeit modifiziert. AM: Aufsteigender Mitteldarm, CA: caeca (Blinddärme), CC: connecting chamber, CIB: cibarium, DM: descending midgut (Absteigender Mitteldarm), EE: external esophagus (Speiseröhre), FC: filter chamber (Filterkammer), HG: hindgut (Enddarm), PSG: primary salivary glands (primäre Speicheldrüsen), PSGD: primary salivary gland duct (Speichelkanal), RS: rectal sac (Rektum), SEG: suboesophageales Ganglion, TAGM: toraxial-abdominale Ganglienmasse.

### Interaktionen zwischen Begomoviren und *B. tabaci* Proteinen

Da alle kryptischen Arten von *B. tabaci* auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeführt werden, wird vermutet, dass die Gene, welche in die Virusübertragung involviert sind, hoch konserviert sind (Brown 2007a; Cicero und Brown, 2011a). Rezeptor-Ligand Mechanismen, die bei Membranfusion, Endozytose oder anderen intrazellulären Transportmechanismen eine Rolle spielen, können auch für die Translokation der Viren und deren Passage durch Weiße Fliege Insekten eine Rolle spielen. Für nicht zirkulativ-übertragene Pflanzenviren wurden entsprechende Rezeptoren und Liganden bereits charakterisiert und eine spezifische Interaktion zwischen dem Protein P2 des *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, *Caulimoviridae*) und der Spitze des Stilettts von Aphiden nachgewiesen (Uzest *et al.*, 2007; Blanc *et al.*, 2011).

Für einige zirkulativ-übertragene Pflanzenviren sind Insektenproteine bzw. Kompartimente bekannt, die mit den Hüllproteinen der Viren interagieren (Gottlieb *et al.*, 2010; Blanc *et al.*, 2011). So zum Beispiel multivesikuläre Kompartimente in Zikadenzellen, die sich mittels eines Aktin-Myosin Transportsystems bewegen (Wei *et al.* 2009). Bei Aphiden, wie *Lipaphis erysimi*, wird die Übertragung von Luteoviren

(*Luteoviridae*) durch Interaktion mit Chaperonen im Darm, die von Endosymbionten der Aphiden abgegeben werden, vermittelt (Banerjee *et al.*, 2004). Bei Thripsen, wie *Frankliniella occidentalis*, wird ein Eindringen von Tospoviren (*Bunyaviridae*) in den Darm durch Interaktion mit Membranfusionsproteinen verhindert (Bandla *et al.*, 1998). Obwohl das Hitzeschockprotein BtHSP16 von *B. tabaci* Hüllproteine von Begomoviren bindet (Ohnesorge *et al.*, 2009), wurde ein spezifischer Rezeptor der Weiße Fliege bisher nicht gefunden (Blanc *et al.*, 2011). Dennoch werden auch hier hoch spezifische Interaktionen der Viren mit Proteinen der Verdauungsorgane und der Hämolymphe vermutet (Cicero und Brown, 2011a).

Nach Überwindung des Verdauungstrakts befinden sich die Viren im Hämocoel, in dem die Hämolymphe zirkuliert. Die Hämolymphe ist eine plasmatische Flüssigkeit, mit mehreren Typen von Zellen (u.a. Hämozyten) und verschiedenen anorganischen Ionen, Proteinen und anderen organischen Komponenten. Eine Aufgabe der Hämozyten ist die Phagozytose von körperfremden Proteinen, Mikroorganismen und Zellbruchstücken. Die Hämolymphe ist somit auch für Begomoviren ein destruktives Medium und stellt eine Barriere dar, die bei der zirkulativen Übertagung überwunden werden muss (Chapman, 1998; Czosnek *et al.*, 2002). Es wird diskutiert, dass durch Bindung der viralen Hüllproteine an Proteine der Hämolymphe, ein Abbau verhindert bzw. ein Transport ermöglicht wird. Interaktionen zwischen viralen Hüllproteinen und Proteinen der Hämolymphe von Weiße Fliegen, wurden bereits untersucht. Dabei wurde eine Bindung an das zur Proteinfamilie der Chaperonine gehörende GroEL belegt, welches die erforderliche Schutzfunktion übernimmt (Morin *et al.*, 1999, 2000; Akad *et al.*, 2004). GroEL, bzw. deren Homologe werden von bakteriellen Endosymbionten synthetisiert und in die Hämolymphe der Insekten abgegeben (van den Heuvel *et al.*, 1994; Bouvaine *et al.*, 2011). In Bakterien ist GroEL, im Komplex mit einer ATPase und dem Ko-Chaperonin GroES, hauptsächlich für die korrekte Faltung von Proteinen verantwortlich (Xu *et al.*, 1997). Darüber hinaus ist es auch in den Infektionszyklus vieler Viren involviert (Hwang *et al.*, 1998; de Beus *et al.*, 2000). Untersuchungen an Aphiden haben gezeigt, dass GroEL auch hier in die Virustransmission dieser Insekten involviert ist (Filichkin *et al.*, 1997). So schützt GroEL Luteoviren vor Abbau in der Hämolymphe (van den Heuvel *et al.*, 1997). Dabei bindet beispielsweise das *Potato leafroll virus* (PLRV) an die äquatoriale Domäne eines GroEL-Homologs des primären Aphiden-Endosymbionten *Buchnera* sp. (Hogenhout *et al.*, 1998). Bei *B. tabaci* wurde *in vitro* eine Interaktion der GroEL-Proteine des bisher nicht kultivierbaren Endosymbionten *Candidatus Hamiltonella defensa* mit TYLCV Hüllprotein festgestellt (Morin *et al.*, 2000; Chiel *et al.*, 2009; Gottlieb *et al.*, 2010). Rana *et al.* (2012) zeigen, dass das GroEL des Endosymbionten *Arsenophonus*, einer

*B. tabaci* MEAM1 Population aus Indien, mit Hüllprotein des Begomovirus *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) interagiert. Auch hier wird der Schutz des Virus durch das Chaperon vor schnellem Abbau im Darm und in der Hämolymphe diskutiert. Im Gegensatz hierzu fehlen bei GroEL-Homologen aus *Rickettsia* und *Wolbachia*, die ebenfalls in *B. tabaci* gefunden wurden, Interaktionen mit TYLCV (Gottlieb *et al.*, 2010). Deshalb wird vermutet, dass vorhandene Endosymbionten, nicht ausschlaggebend für die Virusübertragungsfähigkeit von *B. tabaci* sind, jedoch die Effizienz der Virusübertragung beeinflussen.

*B. tabaci* besitzt je ein Paar primäre Speicheldrüsen (*primary salivary glands*) und ein Paar kleinere akzessorische (sekundäre) Speicheldrüsen (*accessory salivary glands*), deren Ultrastrukturen am Elektronenmikroskop untersucht wurden (Harris *et al.*, 1996; Ghanim *et al.*, 2001b; Cicero und Brown, 2011a). Eine Funktion der Speicheldrüsen für die Übertragung von Begomoviren wird diskutiert (Cicero und Brown, 2010a & b).

Ein weiteres Protein von *B. tabaci*, das den Transport der Begomoviren durch die Organe der Weiße Fliege ermöglichen könnte, ist das Hitzeschockprotein Hsp70 (*heat shock protein 70*) (Tian *et al.*, 1999). Im *Virus overlay protein binding assay* (VOPBA), wurde *in vitro* eine Interaktion zwischen TYLCV Hüllprotein und Hsp70 von *B. tabaci* nachgewiesen (Götz *et al.*, 2012). Hsp70 ist ein 70 kDa Protein, welches zu einer Klasse von Hitzeschockproteinen gehört, die für ihre Rolle bei Proteinfaltungen, Transportvorgängen und Signaltransduktionen bekannt sind. Ihren Namen erhielten die Proteine, da sie sich durch Hitze und anderen Stressoren induzieren lassen. Sie tragen dazu bei, dass Zellen sich vom Hitzestress erholen, indem sie freie Polypeptide, falsch gefaltete Proteine oder falsch exponierte hydrophobe Gruppen von Aminosäuren erkennen und durch ihre Chaperonfunktion in die richtige Konformation zurück falten. Hitzeschockproteine verhindern ein irreversibles Zusammenlagern mit anderen Proteinen und werden auch unter normalen stressfreien Bedingungen synthetisiert. Sie garantieren die korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen, die Homöostase von Proteinen durch Regulation von Proteinfaltungen, sowie den Proteintransport durch intrazelluläre Membranen (Bukau und Horwich, 1998; Höhfeld *et al.*, 2001; Nollen und Morimoto, 2002; Shi und Theg, 2010). Auch bei *B. tabaci* spielt Hsp70 eine wesentliche Rolle bei der Reaktion auf einen Temperaturstress bzw. der Adaption an unterschiedliche Temperaturen (Wan *et al.*, 2009; Yu und Wan, 2009; Lü und Wan, 2011; Elbaz *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012).

## **Die Effizienz der Begomovirusübertragung zweier *B. tabaci* Populationen aus dem Sudan und Zielstellung dieser Arbeit**

In einem sudanesischen Baumwollfeld wurde eine *B. tabaci* Population (63) isoliert, die ähnlich einer zuvor beschriebenen *B. tabaci* Population aus den USA (Rosell *et al.*, 1999) Begomoviren sehr effizient überträgt. In Übertragungstests wurden Virusinfektionen in bis zu 90 % aller infizierten Pflanzen erreicht. Ebenfalls im Sudan, wurde eine weitere *B. tabaci* Population (95) aus einem Kürbisfeld isoliert, die gegenüber der Population 63 eine nur sehr geringe Transmissionsrate für WmCSV aufwies (Gadelseed, Dissertation, University of Gezira, Sudan, 2006). Virusübertragungsexperimente mit *B. tabaci* führten nur in 10 bis 20 Prozent aller behandelten Pflanzen zu Virusinfektionen.

Diese Beobachtungen bildeten die Grundlage für die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Fragestellungen:

1. Sind die unterschiedlichen Übertragungsraten von *B. tabaci* auf die Anpassung der Populationen an unterschiedliche Wirtspflanzen zurückzuführen?
2. Gelten die Unterschiede in der Virusübertragungseffizienz generell für alle zirkulativ übertragenen Begomoviren oder sind bestimmte Begomoviruspezies besonders an *B. tabaci* angepasst, sowie Virusaufnahme, Translokation und Übertragung optimiert?
3. Ist die Besiedelung mit (unterschiedlichen) Endosymbionten für die Übertragungsunterschiede zwischen den Populationen verantwortlich?
4. Bestehen genetische Unterschiede zwischen den *B. tabaci* Populationen 63 und 95 die mit der Virusübertragungseffizienz korreliert werden können?

Die molekularen Faktoren der Übertragung von Begomoviren durch *B. tabaci* sollten untersucht werden, um die für die Virusaufnahme und Translokation kritischen Organe, Barrieren und Rezeptoren der Insekten zu bestimmen. Hierzu wurden alle Experimente mit zwei Begomovirusarten, dem bipartite WmCSV und dem monopartiten TYLCV sowie den *B. tabaci* Populationen 63 und 95 durchgeführt. Die Spezieszugehörigkeit der Insekten wurde zunächst per Sequenzanalyse bestimmt. Anschließend wurde mittels spezifischer PCR auf vorliegende Endosymbionten untersucht. Der Virusgehalt in den Insekten wurde mittels quantitativer PCR ermittelt, die auch für Untersuchungen an isolierten Organen herangezogen wurde. Damit sollten die möglichen Barrieren für die Translokation von WmCSV und TYLCV bestimmt werden.

Für die Passage durch die Organe der Insekten spielt das Virushüllprotein eine besonders bedeutende Rolle. Auch Proteine der Insektenvektoren scheinen eine Rolle

für die Virustranslokation zu spielen, indem sie an das Virushüllprotein binden und den Virustransport im Insekt fördern. In dieser Arbeit wurden die Interaktionen von WmCSV und TYLCV mit Hsp70 von *B. tabaci* untersucht, um eine mögliche Funktion bei der Übertragung von Begomoviren zu bestimmen. Hierzu wurden *hsp70* Genexpressionsvergleiche in virustragenden und virusfreien Insekten sowie Ko-Lokalisierungsstudien durchgeführt.

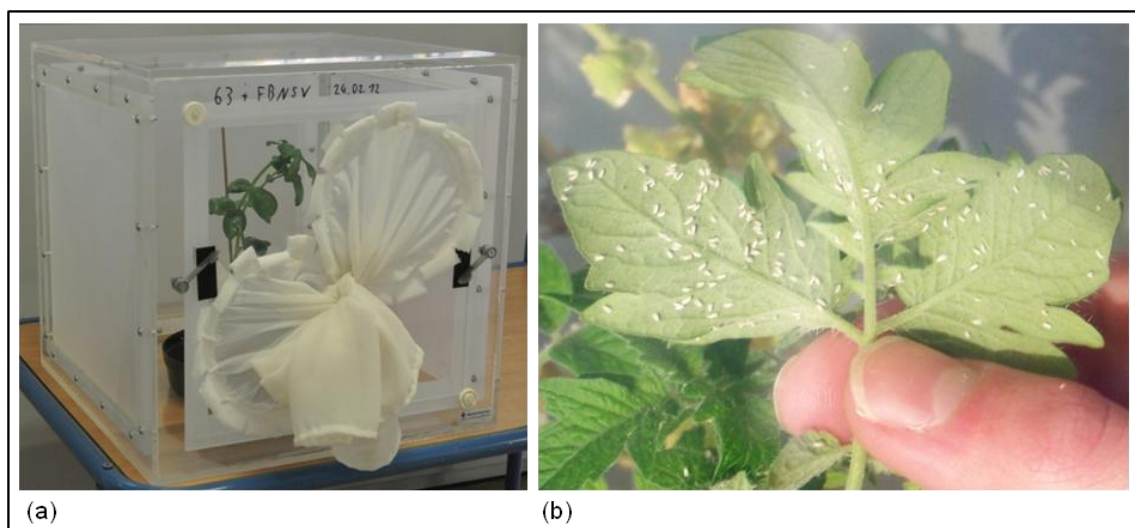
## 2 Material und Methoden

### 2.1 *B. tabaci* Populationen, Herkunft und Haltung

In dieser Arbeit wurden zwei *B. tabaci* Populationen aus dem Sudan untersucht. Die Population 63 stammt aus einem Baumwollfeld, während Population 95 von Kürbis gesammelt wurde. Zur Artbestimmung wurden zwei Referenzpopulationen herangezogen, eine indische *B. tabaci* MEAM1 Population von Sonnenblume und eine spanische Population der Art *B. tabaci* *Mediterranean* (Biotyp Q).

Alle *B. tabaci* Populationen wurden in der Klimakammer bei künstlicher Beleuchtung und Wärmeregulierung (hell/dunkel, 16 h/8 h, 26 °C/18 °C) in insektendichten Käfigen und unter Quarantänebedingungen auf geeigneten Wirtspflanzen erhalten (Abb. 2.1). Als Futterpflanzen dienten Gurken (*Cucumis sativus*), Aubergine (*Solanum melongena*) und Baumwolle (*Gossypium spec.*), die Nicht-Wirtspflanzen für TYLCV und WmCSV sind, während Tomaten (*Solanum lycopersicum* 'Linda') und Wassermelonen (*Citrullus lanatus* 'Sugarbaby') als Viruswirtspflanzen zu den Übertragungsexperimenten verwendet wurden. Weitere Versuchs- bzw. Wirtspflanzen waren Fababohne (*Vicia faba*) und Erbse (*Pisum sativum*).

Alle Versuche mit *B. tabaci* wurden in der Klimakammer bzw. im angeschlossenen Gewächshaus der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt.



**Abbildung 2.1: Haltung von *B. tabaci*.** (a) Insektenkäfig mit Gaze an den Seiten und Penetrationsstulpen an der Front zur Manipulation. (b) Virusfreies Tomatenblatt mit einer Vielzahl von Individuen der *B. tabaci* Population 63 an der Blattunterseite.

## 2.2 Probenahme von Weiße Fliegen

Mittels eines Kunststoffschlauchs bzw. modifizierten Mini-Staubsaugers (BECO, Arnsberg, Deutschland) wurden Weiße Fliege Individuen in eine 1 ml Pipettenspitze gesaugt, die am Schaft mit Gaze insektendicht verschlossen war. Für Übertragungsexperimente wurden Insekten nicht direkt von den Blättern gesaugt, um zu verhindern, dass die in den Blättern steckende Stilette der Tiere nicht abbrechen, was für die Tiere tödlich ist. Zur Vorbereitung der DNA-Extraktionen, wurden die Insekten 5 min bei -20 °C tiefgefroren oder zur Präparation von Insektenorganen in Acetondämpfen betäubt.

## 2.3 Synchronisierung von Weiße Fliegen

Die Menge an TYLCV im Körper von *B. tabaci* variiert mit dem Alter der Insekten. Auch nimmt die Virusmenge sukzessiv ab, wenn Insekten auf Nicht-Wirtspflanzen saugen, weil keine weitere Neuaufnahme stattfindet (Rubinstein & Czosnek, 1997). Für Quantifizierungen war es deshalb erforderlich Individuen gleichen Alters zu verwenden bzw. definierte Zeitparameter konsequent einzuhalten.

Zur Synchronisierung der Weiße Fliegen, wurden junge Auberginen und Baumwoll-Pflanzen für 24 Stunden in die Käfige der jeweiligen Population gestellt. Die adulten Weibchen legten in diesem Zeitraum Eier auf die Unterseiten der Blätter. Anschließend wurden alle adulten Insekten entfernt und die auf den Blättern abgelegten Eier zur Entwicklung von Larven gehalten. Auberginen und Baumwolle wurden zur Entwicklung der Populationen gewählt, da sie den Bedingungen der Klimakammer widerstanden, ohne Blätter abzuwerfen. Ca. 3 bis 4 Wochen nach Eiablage traten adulte Tiere innerhalb von 3 Tagen in Erscheinung, die so ähnlichen Alters waren (synchronisiert).

## 2.4 Präparation von Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen aus *B. tabaci*

In dieser Arbeit wurde, sofern nicht anders erwähnt, mit drei bis fünf Tage alten Individuen gearbeitet. Diese Individuen wurden zur Virusaufnahme fünf Tage auf virusinfizierte und symptomatische Wirtspflanzen transferiert. Nach Virusaufnahme wurden die Insekten für zwei Tage auf Nicht-Wirtspflanzen überführt, um Virusmaterial, das nicht transloziert wurde, aus dem Lumen der Verdauungstrakte zu entfernen. Damit wurde sichergestellt, dass nur Viren detektiert werden, die durch die Insektenorgane passagieren bzw. aufgenommen werden und im Darmlumen befindliche Viren, die Quantifizierung nicht verfälschen. Eine vollständige Entleerung



des Lumens ist aufgrund der Komplexität des Verdauungstrakts nicht möglich, jedoch wird die Zahl der Viren erheblich, unter Umständen bis unter die Nachweisgrenze reduziert und der verfälschende Einfluss damit nahezu ausgeschlossen. Der beschriebene Dekontaminationsvorgang wird im Verlauf dieser Arbeit auch als Entladung des Darms bezeichnet.

Zum Nachweis und Lokalisierung der Viren im Insekt mittels Immunodetektion, quantitativer *real-time* PCR (qPCR) und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) wurden Mitteldärme und Speicheldrüsen der Weiße Fliegen präpariert. Insektenindividuen wurden zunächst in eine mit Gaze verschlossenen Pipettenspitze gesaugt, die anschließend mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) verschlossen wurde. Zur Betäubung der Insekten wurde die Spitze für ca. eine Minute an ein in Aceton getränktes Tuch gehalten.

Insektenorgane wurden auf einem Objektträger (SuperFrost plus, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) unter Zuhilfenahme eines Binokulars (Olympus SZX16; Objektiv SDF PLAPO 1XPF, maximale Vergrößerung 11,5-fach) präpariert. Hierfür wurden 8 µl Extraktionspuffer vorgelegt, in den ein Insektenindividuum eingebracht wurde. Mit feinen Präpariernadeln wurden dann Mitteldarm bzw. die primären Speicheldrüsen entnommen. Der so extrahierte Mitteldarm wurde mit einer Augenwimper in einen klaren Tropfen Puffer überführt und gespült. Für die qPCR wurde der Mitteldarm mit einer Wimper in ein mit 10 µl ddH<sub>2</sub>O befülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

Speicheldrüsen konnten aufgrund ihrer fragilen Beschaffenheit nicht ohne Beschädigung durch die Wimper überführt werden, sodass nach Extraktion der Speicheldrüsen zunächst eine Flüssigkeitsbrücke aus Extraktionspuffer (Spültropfen) hergestellt wurde, um die Speicheldrüsen schonend durch zu waschen. Unter Ausnutzung der Oberflächenspannung des Spültropfens wurden die Speicheldrüsen mit der Wimper aus den Spültropfen gehobelt, in ein mit 10 µl ddH<sub>2</sub>O gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

Für Untersuchungen mittels FISH bzw. Immunodetektion wurde der Spültropfen, in dem sich Mitteldarm bzw. Speicheldrüsen befanden, mit einem fusselfreien Tuch abgesaugt und anschließend die jeweilige Fixierung durchgeführt (s. Punkt 2.21).

Für die fotografische Darstellung von Mitteldärmen und Speicheldrüsen im Durchlicht, wurde ein Lichtmikroskop mit 40-facher Vergrößerung benutzt (AXIO Scope A1, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) und zusätzlich ein differenzieller Interferenzkontrast verwandt. Alle Fotografien wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen (Nikon D90, Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland).

Extraktionspuffer (1 Liter)

8	g	Natriumchlorid (NaCl)
0,2	g	Kaliumchlorid (KCL)
1,44	g	Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
0,24	g	Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )

Mit Natriumhydroxid pH 7,4 eingestellt und autoklaviert bei 121 °C.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Puffer wurden in doppelt deionisiertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) angesetzt.

**2.5 Isolation von Hämolympflüssigkeit aus *B. tabaci***

Für die Bestimmung des Gehalts an Begomoviren in der Hämolymphe von *B. tabaci*, wurde Hämolymphe aus Insekten unter Verwendung eines Stereomikroskops (ca. 90-fache Vergrößerung) präpariert.

Zuvor wurden synchronisierte Weiße Fliegen, wie unter Punkt 2.2 beschrieben mit Hilfe eines Mini-Staubsaugers von der Wirtspflanze gesaugt, drei Minuten mit Aceton betäubt und auf Eis gelagert. Jeweils ein Weibchen wurde in 8 µl Mineralöl (Sigma life science Bio Ultra Mineral Oil, 69794-500ML, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), der auf einem Glasobjektträger vorgelegt war, überführt. Dabei löste sich die Wachsschicht, des Chitinpanzers und der Flügel im Öl. Das Insekt wurde in einem zweiten Mineralöltropfen gespült und dann in einen weiteren Tropfen überführt. Mit kleinen Präpariernadeln wurde der Thorax des Insekts dorsal in der Nähe der Flügelmuskulatur punktiert. Unter leichtem Druck auf den Thorax trat wässrige Hämolymphe aus, die im Öltropfen sphärisch zusammenlief. Mit einer Pipettenspitze (Spitzen, 10 µl, farblos, DNase-, RNase-frei, Art. Nr.: 720031, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland) wurde die Hämolymphe mitsamt einem Teil des Öls aufgenommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, in dem 10 µl Mineralöl vorgelegt waren, überführt und bis zur qPCR bei -20 °C aufbewahrt. Das verwendete Mineralöl beeinträchtigte die anschließende qPCR nicht.

Der pH-Wert der Hämolymphe wurde mittels Spezialindikatorpapier (pH 4,0-7,0; Merck, Darmstadt, Deutschland) bestimmt. Dazu wurde die aus 10 Individuen in Mineralöl vereinigte Hämolymphe der Populationen 63 und 95 in 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Der Ansatz wurde gemischt und dann 20 Sekunden zentrifugiert (10000 g). Die wässrige Phase wurde auf das pH-Papier pipettiert und die Farbänderung mit der pH-Skala verglichen.

## **2.6 Extraktion von Nukleinsäure aus Weiße Fliegen, Wirtspflanzen und Bakterien**

Im Folgenden sind alle Nukleinsäure-Extraktionsmethoden aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden. In Vorversuchsreihen hatten sich diese DNA-Extraktionsmethoden im Vergleich mit anderen DNA-Extraktionsmethoden als herausragend für die Isolierung von Nukleinsäure erwiesen.

### **2.6.1 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen nach Protokoll von Shahjahan *et al.*, (1995)**

Das Original-Protokoll wurde für die Extraktion aus Weiße Fliegen modifiziert. 50 oder 100 inaktivierte Weiße Fliegen wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Insekten wurden mit 150 µl CTAB Puffer überschichtet und mittels eines Pistills gemörsert (VWR Pellet Mixer, European Article No. 431-0100, VWR international, UK). Anschließend wurde der Ansatz 45 Minuten bei 37 °C inkubiert und danach für 5 Minuten bei 14000 g zentrifugiert (mini Spin plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 1 Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol [25/24/1, (v/v/v)] zugegeben. Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Invertieren des Eppendorf-Reaktionsgefäßes gemischt und anschließend bei 14000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die organische Phase verworfen.

Der wässrige Extrakt wurde mit 1 Volumen Chloroform / Isomaylalkohol [24/1, (v/v)] versetzt und gemischt. Es erfolgte eine weiterer Zentrifugationsschritt zur Phasentrennung, nachdem die wässrige obere Phase dekantiert und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde. Zur Präzipitation wurden 0,2 Volumen 5 N Natriumchloridlösung und 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben. Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Invertieren gemischt und zentrifugiert für 10 min bei 10000 g. Optional kann der Ansatz vor der Zentrifugation für eine bessere Ausbeute 20 Minuten bei -20 °C oder über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Das erhaltene Pellet wurde vom Überstand befreit und mit 0,5 ml 70%igem Ethanol gespült (gewaschen). Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten. Der Ethanol wurde entfernt und der Waschschrift noch einmal wiederholt. Das Pellet wurde kurz getrocknet und für 10 min bei 65 °C in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Anschließend wurde die Reinheit und Konzentration über die spezifische Lichtabsorption bei 260 nm bestimmt (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000,

PEQLAB, Erlangen, Deutschland). Jeweils 5 µl wurden in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

#### CTAB Puffer (1 Liter)

12,11 g	TRIS
81,82 g	Natriumchlorid
5,84 g	EDTA
2 %	CTAB (H5882, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)

TRIS-Lösung mit Salzsäure auf pH 8 eingestellt, dann Zugabe der weiteren Chemikalien. Autoklaviert bei 121 °C.

0,2 % β-Mercaptoethanol (Zugabe unmittelbar vor Benutzung)

### **2.6.2 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN)**

50 oder 100 Insekten wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Puffer AP1 überschichtet. Der Ansatz wurde mit einem Pistill gemörkert und das Pistill mit 300 µl AP1 abgespült. Je Ansatz wurden 4 µl RNase A dazugeben. Die Extraktion wurde fortgeführt mit Punkt 8 des *Plant tissue mini protocol* des *DNeasy Plant Mini Kits* (QIAGEN, Hilden, Deutschland). Die Elution erfolgte mit 100 µl Puffer AE.

Anschließend wurde die Reinheit und Konzentration über die spezifische Lichtabsorption bei 260 nm bestimmt (NanoDrop *Spectrophotometer* ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland). Jeweils 5 µl wurden in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die restliche DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### **2.6.3 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels *High Pure Template Preparation Kit* (Roche)**

Die DNA-Extraktion wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurden folgende Änderungen bzw. Erweiterungen vorgenommen: 100 Insektenindividuen wurden in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach Zugabe von 100 µl *tissue lysis buffer* wurde mit einem Mini-Pistill gemörkert, das anschließend mit 100 µl *tissue lysis buffer* abgespült wurde. Dann wurden 40 µl Proteinase K hinzugefügt und der Ansatz gemischt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Morgen wurden weitere 20 µl Proteinase K hinzugegeben und der Ansatz erneut inkubiert (1,5 h, 55 °C).

Anschließend wurde nach Protokoll (Seite 13, Punkt 6) weiterverfahren und die Nukleinsäure in 150 µl Elutionspuffer aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde bei 260 nm mittels Spektrophotometer (NanoDrop ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) gemessen. Jeweils 5 µl wurden in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die restliche DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.6.4 DNA-Extraktion aus Einzelindividuen nach Frohlich *et al.*, (1999)**

Die im Jahr 1999 publizierte Extraktionsmethode für DNA aus Weiße Fliegen Einzelindividuen wurde für diese Arbeit modifiziert.

Eine Petrischale wurde mit zwei Schichten Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) bespannt und ein 5 µl Tropfen Lysepuffer vorgelegt, in dem ein *B. tabaci* Individuum hineingegeben wurde. Mit dem Konus eines Eppendorf-Reaktionsgefäß, das als Pistill fungierte wurde das Insekt im Tropfen gemörsert, danach weitere 35 µl Lysepuffer hinzugegeben und nach mischen in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden alle Ansätze auf Eis aufbewahrt, dann für 15 min bei 65 °C und schließlich 10 min bei 95 °C inkubiert. Sofort danach wurden die Ansätze auf Eis gestellt, das Kondenswasser herunterzentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C bzw. bei -20 °C aufbewahrt.

##### Lysepuffer

50	µl	TRIS-Lösung [1 mol/l], mit Salzsäure auf pH 8 eingestellt, steril
10	µl	EDTA-Lösung [0,5 mol/l], steril
50	µl	Triton X-100
500	µl	Proteinase K [20 mg/ml]
9,39	ml	ddH <sub>2</sub> O

Lagerung bei -20 °C.

#### **2.6.5 RNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN)**

Eine Gesamt-RNA-Extraktion aus je 100 virustragenden und virusfreien Weiße Fliegen wurde nach dem *Protocol Plant + Fungi* des *RNeasy Plant Mini Kits* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden Individuen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 100 µl Puffer RLT überschichtet. Der Ansatz wurde mit einem Pistill gemörsert und das Pistill mit 350 µl Puffer RLT abgespült. Der Ansatz wurde gemischt

(Vortex-Genie2, Scientific Industries, USA) und die Extraktion fortgeführt mit Punkt 4 des *Protocol Plant + Fungi*. Die Elution erfolgte einmal mit 50 µl RNase freiem Wasser. Anschließend wurde die Reinheit und Konzentration über die spezifische Lichtabsorption bei 260 nm bestimmt (NanoDrop *Spectrophotometer* ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland) und jeweils 5 µl in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die restliche RNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.6.6 DNA-Extraktion aus Wirtspflanzen nach Dellaporta und DNeasy (QIAGEN)

Für die DNA-Extraktion aus den Wirtspflanzen wurde das folgende Protokoll verwandt, welches auf der Dellaporta-Methode beruht (Weigel und Glazebrook, 2009). Dabei wurde DNA aus Pflanzenmaterial extrahiert ohne Verwendung der gesundheitsschädlichen Substanzen Phenol und Chloroform.

Es wurden ca. 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert. Es folgte eine Zugabe von 500 µl Dellaporta Extraktionspuffer. Dann Transfer in ein 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß und Zugabe von 33 µl einer 20%igen SDS-Lösung. Vermischen (Vortex-Genie2, Scientific Industries, USA) und Inkubation für 10 min bei 65 °C. Zugabe von 160 µl einer 5-molaren Kaliumacetatlösung (pH 4,8) und vermischt. Dann Zentrifugation (10 min, RT, 14000 g; mini Spin plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und Abnahme von 450 µl des Überstands, sowie Transfer in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß. Zugabe von 0,5 Volumen Isopropanol und erneut gemischt. Dann wurde der Ansatz zentrifugiert (10 min, RT, 14000 g) und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation (5 min, RT, 14000 g). Das Pellet wurde kurz getrocknet und dann in 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Anschließend wurde die Reinheit und Konzentration über die spezifische Lichtabsorption bei 260 nm bestimmt (NanoDrop *Spectrophotometer* ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland). Jeweils 5 µl wurden in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die restliche DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

#### Dellaporta Extraktionspuffer (1 Liter)

12,11 g	TRIS
14,61 g	EDTA
29,22 g	Natriumchlorid

Mit Salzsäure wurde die TRIS-Lösung auf pH 8 eingestellt, dann Zugabe der weiteren Chemikalien. Autoklaviert bei 121 °C.

Vor Verwendung in 10 ml Puffer:

100	µl	RNaseA [10 mg/ml] und
8,7	µl	β-Mercaptoethanol frisch hinzugegeben.

Optional wurden DNA-Extraktionen aus Wirtspflanzen nach dem *DNeasy Plant Mini Protocol* des *DNeasy Plant Mini Kits* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

## **2.6.7 Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* und Agro-Inokulation zur Virusinfektion von Pflanzen**

### **2.6.7.1 Kultur von transgenen Agrobakterien mit WmCSV bzw. TYLCV**

Zur Herstellung einer Schüttelkultur wurden mit einer sterilen Impföse Bakterien vom Festmedium gepickt und 3 ml YEB-Flüssigmedium angeimpft. Dem YEB-Medium wurden in der Endkonzentration 240 µg/ml Magnesiumsulfat (steril filtriert), 100 µg/ml Rifampicin, sowie 80 µg/ml Kanamycin bzw. 25 µg/ml Gentamycin zugesetzt. Es folgte eine Inkubation über Nacht, bei 28 °C, unter Schütteln (180 rpm).

#### Ausgangsmaterial auf YEB-Medium in Petrischalen

- *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 mit einer WmCSV DNA A Genomkomponente in pBin19  
Resistenzen gegen Antibiotika: Rifampicin (Agrobakterium)  
Kanamycin (Vektor)
- *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 mit einer WmCSV DNA B Genomkomponente in pBin19  
Resistenzen gegen Antibiotika: Rifampicin (Agrobakterium)  
Kanamycin (Vektor)
- *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mit einem dimären Konstrukt des TYLCV Genoms in pCGN1547  
Resistenzen gegen Antibiotika: Rifampicin (Agrobakterium)  
Gentamycin (Vektor)

YEB-Medium (1 Liter)

3	g	Rinderextrakt (Merck, Darmstadt, Deutschland)
1	g	Hefeextrakt (Merck, Darmstadt, Deutschland)
5	g	Baktopepton (Merck, Darmstadt, Deutschland)
5	g	Saccharose

Mit 1 N Natriumhydroxid-Lösung auf pH 7,2 eingestellt und autoklaviert bei 121 °C. Lagerung bei 4°C.

**2.6.7.2 Infiltration von Wirtspflanzen**

Wie viele Begomoviren sind auch WmCSV und TYLCV nicht durch mechanische Verwundung auf Wirtspflanzen zu übertragen. Zur Inokulation der Pflanzen können klonierte, vollständige Virusgenome in *A. tumefaciens* Bakterien, durch die sogenannte Agro-Inokulation in Pflanzen eingebracht und aktiviert werden, so dass Virusinfektionen entstehen.

Aus den 3 ml der Schüttelkultur (Vorkultur) wurden 300 bis 500 µl in 50 ml YEB-Medium (Hauptkultur) überführt. Die Hauptkultur wurde über Nacht, bei 28 °C, unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation für 8 min bei 4000 g und Raumtemperatur pelletiert. Das Pellet wurde in MMA-Medium resuspendiert und die Suspension auf eine OD<sub>600</sub> zwischen 0,5 und 0,7 eingestellt. Zur Pflanzeninfektion wurde die Suspension in eine 5 ml Spritze aufgenommen und mit einer feinen Kanüle in Sprossachsen der Wirtspflanzen injiziert. Zur Aktivierung der virGene, Insertion von Verwundungsorten, wurden ca. 15 Einstiche pro Pflanze an verschiedenen Stellen der Sprossachse verabreicht.

YEB-Hauptkultur

50	ml	YEB-Medium
50	µl	Rifampicin [100 mg/ml]
100	µl	Magnesiumsulfat [1 mol/l]
500	µl	MES [1 mol/l]
20	µl	Acetosyringon [50 mmol/l]
300-500 µl		Vorkultur

Je nach Plasmidresistenz Zugabe von 50 µl Kanamycin [80 mg/ml] bzw. 25 µl Gentamycin [25 mg/ml].



MES-Lösung (1 Liter)

195,2 g      MES

Mit Kaliumhydroxid auf pH 5,6 eingestellt und steril filtriert.

MMA-Medium

100 ml      MS-Medium  
1 ml      MES-Lösung [1 mol/l]  
100 µl      Acetosyringon [200 mmol/l]

Lagerung bei 4 °C.

MS-Medium (1 Liter)

2,6 g      MS (Murashige and Skoog Medium)  
20 g      Saccharose

Mit Kaliumhydroxid auf pH 5,6 eingestellt und autoklaviert bei 121 °C. Lagerung bei 4 °C.

**2.6.7.3 DNA-Extraktion aus Agrobakterien**

Um für die Standardkurven der absoluten Quantifizierung von WmCSV und TYLCV reine DNA zur Verfügung zu haben, mussten die Virusgenome von *Agrobacterium tumefaciens* in *Escherichia coli* transferiert werden. Dazu wurden die virustragenden Plasmide aus Agrobakterien extrahiert und kompetente *Escherichia coli* mit ihnen transformiert (s. Punkt 2.8.2).

Zur DNA-Extraktion wurden 2 ml einer Flüssigkultur bei 10000 g für 3 min bei RT zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml TE-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 125 µl eines 10%igen SDS und 165 µl Proteinase K [10 mg/ml], wurde für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 165 µl einer 5-molaren Natriumchloridlösung, gefolgt von einer Inkubation für 30 min bei 68 °C. Zur Fällung der Proteine wurden 500 µl Phenol / Chloroform [1/1, (v/v)] zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und zentrifugiert (5 min, 14000 g, RT; mini Spin plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der Nukleinsäuren 1/10 Volumen einer 3-molaren Natriumacetatlösung (pH 5,5) und 2,5 Volumen Ethanol (98 %) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 20 min bei -20 °C. Anschließend wurde der Ansatz zentrifugiert (30 min, 14000 g, RT) und das erhaltene Pellet in 300 µl TE-Puffer

aufgenommen. Es erfolgte eine Zugabe von 2 µl RNase A [10 mg/ml], gefolgt von einer Inkubation für 10 min bei 37 °C. Die Fällungsschritte wurden wiederholt und das Zentrifugationspellet mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 14000 g und 4 °C. Der Ethanol wurde entfernt, das Pellet kurz getrocknet und dann in 50 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. 5 µl der DNA wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

#### TE-Puffer (1 Liter)

1,21	g	TRIS
0,29	g	EDTA

TRIS-Lösung mit Salzsäure auf pH 8 eingestellt, dann Zugabe von EDTA.  
Autoklaviert bei 121 °C.

#### **2.6.8 Plasmid-DNA-Extraktion aus *Escherichia coli* nach dem NucleoSpin Plasmid Protocol (MACHEREY-NAGEL)**

Die DNA-Minipräparation aus *Escherichia coli* DH5α Übernachtskulturen erfolgte durch Verwendung des *NucleoSpin Plasmid Protocol* (MACHEREY-NAGEL, Düren, Deutschland, 2006). Dieses Protokoll ermöglicht die Reinigung von bis zu 25 µg vielzähliger (*high-copy*) Plasmid-DNA aus 1 – 5 ml *Escherichia coli* Übernachtskulturen in LB-Medium. Dabei wird die negativ geladene DNA bei relativ hoher Salzkonzentration an ein Säulenmaterial (*silica membrane*) gebunden, sowie degradierte RNA und Proteine ausgewaschen. Die Elution der DNA erfolgt bei einer niedrigeren Salzkonzentration. 5 µl der DNA wurden in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Reinheit und Konzentration der DNA wurde über die spezifische Lichtabsorption bei 260 nm bestimmt (NanoDrop Spectrophotometer ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland). Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei –20 °C.

#### Übernachtskultur:

3 ml LB-Medium (s. Punkt 2.8.2)

3 µl Antibiotika je nach Resistenzgen des Plasmids:

Plasmid:	Resistenz gegen:	Konzentration Stammlösung:
pCGN1547	Gentamycin	20 µg/ml
pBin19	Kanamycinmonosulfat	25 µg/ml

Mittels Impfnadel mit der jeweiligen *Escherichia coli* Kultur angeimpft.

## 2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Trennung und Identifizierung der RNA- und DNA-Fragmente wurden 1%ige und 2%ige Agarosegele verwendet. Je nach Größe des Gels wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1 x TAE-Puffer aufgenommen und durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Nach kurzer Abkühlung erfolgte der Zusatz von Ethidiumbromid (2000/1, v/v, Stammlösung [5 mg/ml]). Dann wurde das Gel in einen Gelträger gegossen, sowie der Probenkamm gesetzt. Nach Erstarren des Gels wurde dieses in einer Elektrophoresekammer (Bethesda Research Laboratories, Serie 1087) mit 1 x TAE-Laufpuffer überschichtet. Für RNA-Gele wurden, um Kontaminationen mit RNasen zu verhindern, Gelkammer und Gelträger, zuvor mit 10%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gereinigt und anschließend die Kammer mit autoklaviertem 1 x TAE-Laufpuffer gefüllt. Die Nukleinsäure-Proben wurden mit 0,5 Volumen an Glycerolstopper (*Loading Buffer*) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde abhängig von der Gelgröße für 45 - 60 min bei 70 - 120 Volt durchgeführt. Durch Bildung von stark fluoreszierenden Nukleinsäure-Ethidiumbromid-Komplexen konnten die aufgetrennten Fragmente bei Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht, sowie fotodokumentiert werden (INTAS, Mitsubishi Electric, Ratingen, Deutschland). Dargestellt sind Aufnahmen mit invertiertem Kontrast. Somit sind die unter UV-Licht fluoreszierenden Nukleinsäure-Ethidiumbromid-Komplexe als dunkle Banden auf hellen Grund auf den Fotos auszumachen. Die Größenbestimmung der Fragmente erfolgte mit dem  $\lambda$ -PstI-DNA-Längenstandard (Marker), der DNA-Fragmente mit genau definierter Größe des Phagen Lambda ( $\lambda$ ) enthält, der mit dem Restriktionsenzym PstI gespalten wurde. Zur Größenbestimmung kleinerer Fragmente wurde der Hyperladder IV (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) verwandt.

### Glycerolstopper (1 Liter)

50 % (v/v)	Glycerol
0,4 % (w/v)	Bromphenolblau
1,19 g	Natriumdihydrogenphosphat

Mit Natriumhydroxid pH 7,0 eingestellt.

### 50 x TAE-Puffer (1 Liter)

242,18 g	TRIS
136,08 g	Natriumacetat (Trihydrat)
14,61 g	EDTA

Mit Ethansäure pH 8,2 eingestellt,  
autoklaviert bei 121 °C.

## 2.8 Speziesbestimmung durch Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom-Oxidase I (mtCOI) Gens

Je Weiße Fliegen Population wurde aus 100 Individuen die DNA extrahiert (s. Punkt 2.6.3 und Anhang 6.1.3). Jeweils 2 µl der DNA wurden in die nachfolgend beschriebene Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) zur Amplifizierung der mtCOI eingesetzt. Die PCR Produkte (s. Anhang 6.2) wurden mit dem Vektor pDrive ligiert (s. Punkt 2.8.1). Anschließend wurden kompetente *Escherichia coli* DH5α mit dem Konstrukt transformiert (s. Punkt 2.8.2) und nach einer Blau-Weiß-Selektion jeweils drei weiße Übernachtminikulturen herangezogen. Die klonierte Plasmid-DNA wurde mittels *NucleoSpin Plasmid Protocol* (MACHEREY-NAGEL) extrahiert (s. Punkt 2.6.8) und anschließend mittels Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten (s. Punkt 2.9 und Anhang 6.2), sowie sequenziert (s. Punkt 2.8.4).

### PCR mit Oligonukleotide (Primer) für mtCOI

Primer nach Frohlich *et al.*, 1999

Einfacher Reaktionsansatz:

2	µl	Matrizen-DNA	
2,5	µl	10x PCR Puffer	} Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
0,5	µl	dNTPs [10 µmol/l]	
1,25	µl	Magnesiumchlorid [50 µmol/l]	
0,5	µl	<i>Taq</i> -Polymerase [500u/ml]	
0,1	µl	Primer C1-J-2195 [100 µmol/l]	
0,1	µl	Primer L2-N-3014 [100 µmol/l]	
<u>18,05</u>	<u>µl</u>	<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	
25	µl		

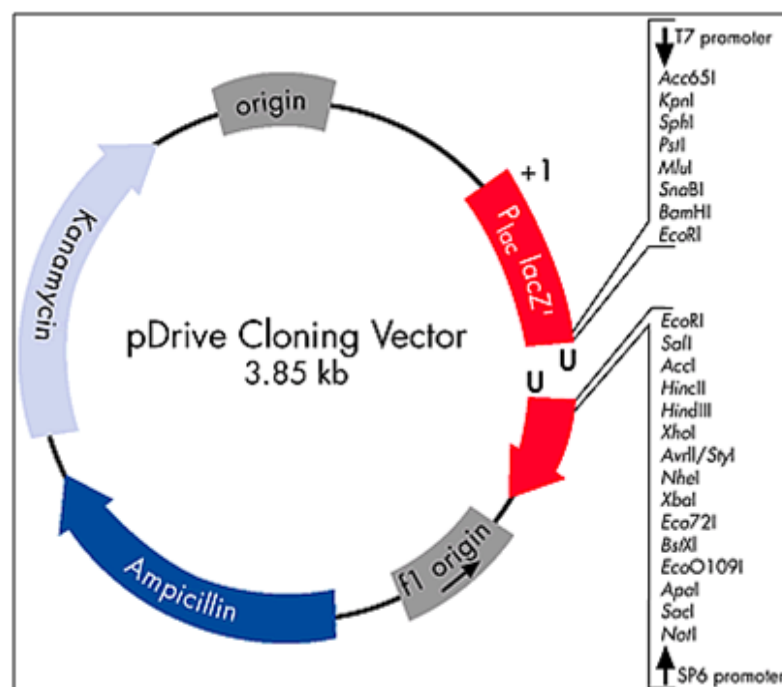
Programm der PCR-Maschine (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland):

95 °C	3 min		Denaturierung
95 °C	1 min	} 30 Zyklen	Denaturierung
52 °C	1 min		Anlagerung der Primer ( <i>Annealing</i> )
72 °C	1 min		Synthese
72 °C	10 min		Abschließender Syntheseschritt
10 °C	∞		Lagertemperatur

5 µl des Produkts wurden in 1%igen Agarosegel aufgetragen.

### 2.8.1 Ligation der PCR Produkte

Zur Vervielfältigung der durch PCR erhaltenen Nukleinsäureketten, wurden diese mit Plasmiden ligiert und die erhaltenen Konstrukte in *Escherichia coli* DH5α transformiert. Bei der Ligation wird das 3'-Hydroxyl- und das 5'-Phosphat-Ende einer oder mehrerer linearer Nukleinsäuren mit Hilfe von Enzymen (Ligasen) verbunden. Die in dieser Arbeit amplifizierten Nukleinsäuren der mtCOI wurden mit bereits linearisierten Plasmiden (Vektor pDrive), unter Verwendung des *PCR Cloning Kits* (QIAGEN, Hilden, Deutschland), ligiert. Dieses Ligationsverfahren wurde optimiert für die komplementäre Bindung zwischen einem Adenosin-Überhang zu beiden Seiten der amplifizierten DNA, und dem Uridin-Überhang am Vektor pDrive (Abb. 2.2). Aufgrund der Verwendung der *Taq* DNA-Polymerase in der oben beschriebenen PCR war am Amplifikat ein entsprechender 3'-Adenosin-Überhang transferiert. Tabelle 2.1 gibt den Pipettieransatz für eine Ligationsreaktion wieder. Die Reaktion erfolgte für zwei Stunden bei 4 °C. Anschließend wurde der Ansatz, mit den darin enthaltenen Ligasen, für zehn Minuten bei 70 °C inaktiviert. Die abgestoppte Reaktion wurde dann auf Eis gestellt und sofort für die nachfolgende Transformation weiterverwandt.



**Abbildung 2.2: pDrive Cloning Vektor.** Der pDrive Cloning Vektor liegt in linearer Form vor. Herausgestellt ist die *Multiple Cloning Side* (MCS) innerhalb des *lacZ*-Gens mit einer Reihe von Restriktionsschnittstellen und den Promotoren T7 und SP6 zu jeder Seite der MCS. Des Weiteren befinden sich auf dem Vektor einen *lac*-Promotor ( $P_{lac}$ ) und Resistenzgene für eine Ampicillin-, sowie Kanamycinresistenz.

**Tabelle 2.1: Ligationsansatz für eine einfache Reaktion.** (10 µl Gesamtvolumen)

Komponente	Eingesetztes Volumen
DNA (PCR Produkt)	4 µl
pDrive Vektor [50 ng/µl]; ( <i>PCR Cloning Kit</i> , QIAGEN)	1 µ
Master Mix Ligation ( <i>PCR Cloning Kit</i> , QIAGEN)	5 µ

### 2.8.2 Transformation von *Escherichia coli* Zellen durch Elektroporation

Unter Transformation wird das Eindringen freier, extrazellulärer DNA in einem Rezipienten verstanden. Dazu muss der Rezipient im Stadium der Kompetenz und die extrazelluläre DNA doppelsträngig vorliegen. Begünstigen kann man eine Transformation durch eine Elektroporation des Rezipienten. Die Elektroporation ist ein Verfahren, bei dem elektrische Impulse angewandt werden, um Zellen zur Aufnahme von DNA zu befähigen und sie somit kompetent zu machen (Madigan *et al.*, 2006).

Bei der Transformation elektrokompenter *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurden diese langsam auf Eis aufgetaut und unter der Sterilbank (*Hera safe*, Heraeus, Thermo scientific, Deutschland) mit 3 µl Plasmid-DNA aus der Ligation versetzt. Mit einer sterilen Pipette wurden die Zellen in eine Einwegküvette (2 mm *électroporation cuvette*, Enrogentec, San Diego, USA) überführt. Die Küvette wurde verschlossen und in einem *GenePulser II* (Bio-Rad, Hercules, München, Deutschland) für 3 Sekunden bei 250 V elektroporiert. Anschließend wurde die Küvette mit 1 ml SOC-Medium gespült und die Suspension in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Ansatz wurde für 1,5 h bei 37 °C unter schütteln inkubiert (100 rpm, *Environmental Shaker ES-20*, Biosan, Riga, Lettland). Anschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf Ampicillin-haltigen LB-Medium ( $c_{\text{Amp}} = 100 \mu\text{g/ml}$ ) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Ausplattieren der *Escherichia coli* Zellen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### SOC-Medium (Hanahan)

0,98 % (v/v)	SOB-Medium
0,01 % (v/v)	Glucose-Lösung (sterile Stammlösung [2 mol/l])
0,01 % (v/v)	Magnesiumchlorid-Lösung (sterile Stammlösung [2 mol/l])

Folgende Medien wurden mit einfach destilliertem Wasser angesetzt und autoklaviert. Die Stammlösungen für Ampicillin, Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) wurden sterilfiltriert (Filter: Minisart, Porenweite 0,20 µm, Sartorius, Göttingen, Deutschland).

SOB-Medium (*super optimal broth*, Hanahan)

2 % (w/v)	Bacto-Pepton (Difco, Voigt Global Distribution, Lawrence, USA)
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt (Merck, Darmstadt, Deutschland)
0,0158 % (w/v)	Kaliumchlorid
0,0584 % (w/v)	Natriumchlorid

Autoklaviert bei 121 °C.

LB-Medium (Luria Bertani)

1 % (w/v)	Bacto-Trypton (Difco, Voigt Global Distribution, Lawrence, USA)
0,5 % (w/v)	Hefeextrakt (Merck, Darmstadt, Deutschland)
1 % (w/v)	Natriumchlorid

Mit Natriumhydroxid pH 7,5 eingestellt.

Für LB-Agarplatten zusätzlich Zugabe von

1,5 % (w/v)	Bacto-Agar (Difco, Voigt Global Distribution, Lawrence, USA).
-------------	---

Autoklaviert bei 121 °C.

nach Abkühlung 100 µg/ml Ampicillin (Stammlösung [100 mg/ml]), 47 µg/ml IPTG (Stammlösung [47 mg/ml]) und 40 µg/ml X-Gal (Stammlösung [40 mg/ml]) zugegeben.

### **2.8.3 Blau-Weiß-Selektion und Klonierung transformierter *Escherichia coli* Zellen in Flüssigkultur**

Die auf den Ampicillin-haltigen LB-Platten gewachsenen *Escherichia coli* DH5α Klone aus der Transformation wurden über Nacht in Flüssigkultur inkubiert (37 °C, 200 rpm), um in der anschließenden Präparation die Ausbeute an Plasmid-DNA zu erhöhen. Dabei wurde die Blau-Weiß-Selektion angewandt.

Durch eine erfolgreiche Ligation von Fremd-DNA und pDrive wurde das *lacZ'*-Gen im Vektor zerstört (Abb. 2.2). Dieses Gen codiert für ein funktionales Fragment der β-Galactosidase, ein Enzym das X-Gal, welches dem LB-Medium zugesetzt wurde, hydrolysiert. Dabei wird ein blauer Farbstoff gebildet, der die Bakterienkolonien blau erscheinen lässt. Bakterienkolonien die keine β-Galactosidaseaktivität aufweisen erscheinen weiß. Bakterien die während der Transformation kein Plasmid aufgenommen haben, konnten sich aufgrund fehlender Ampicillin-Resistenz nicht vermehren (Madigan *et al.*, 2006).

Zur Klonierung der transformierten *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  Zellen wurden unter sterilen Bedingungen jeweils mindestens zwei verschiedene weiße Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze in je ein steriles Reagenzglas mit 3 ml LB-Medium und Ampicillin ( $c_{\text{Amp}} = 100 \mu\text{g/ml}$ ) überimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler bei 120 rpm inkubiert. Diese Kolonien wurden ebenfalls auf eine Ampicillin-haltige LB-Platte (*master plate*) zum möglichen Ansetzen weiterer Übernachtskulturen überimpft.

#### 2.8.4 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die durch die Restriktionsanalyse als erfolgreich ligiert und kloniert bestätigten Genfragmente der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase I mussten für die Sequenzanalyse sequenziert werden. Dazu wurden 15  $\mu\text{l}$  der Plasmid-DNA in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und die DNA im Heizblock (Thermomixer *comfort* 1,5 ml, Eppendorf) durch Verdampfen des Wassers bei 55 °C eingetrocknet. Die getrocknete DNA wurde zur automatisierten Sequenzierung zur Eurofins MWG GmbH (Martinsried, Deutschland) gesandt und dort mit Hilfe der Primer T7 und SP6, die an die Flanken der *multiple cloning side* des Vektors anlagern, sequenziert.

Die ermittelten Sequenzen wurden in das Sequenzanalyse- und Datenverwaltungsprogramm *Vektor NTI Advance 10.0* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) geladen und zunächst mittels einer BLAST Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bestätigt. Zum Vergleich der Sequenzen wurde dann ein „*Alignment*“ der DNA-Sequenzen mittels Clustal X (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführt.

#### 2.9 Restriktionsanalyse (Testspaltung)

Die Restriktionsanalyse, bei der mit Hilfe von Restriktionsenzymen DNA an spezifischen Erkennungsstellen gebunden und gespalten wird, wurde eingesetzt, um die Identität von Plasmidinserts zu überprüfen. Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs und spalten die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch (Lottspeich & Zorbas, 1998).

Dazu wurden 3  $\mu\text{l}$  der DNA aus der PCR bzw. Minipräparation mit 1  $\mu\text{l}$  Enzympuffer (Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland), 0,5  $\mu\text{l}$  Restriktionsenzym (Tab. 2.2) und 5,5  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O vermischt. Die Restriktionsspaltung erfolgte für 1,5 h bei 37 °C. Danach wurde das Enzym für 5 min bei 97 °C hitzeinaktiviert. Die Restriktion wurde mittels Gelelektrophorese überprüft (s. Punkt 2.7).



**Tabelle 2.2: Spezifizierung verwendeter Typ-II-Restriktionsenzyme.** [A Adenin, C Cytosin, G Guanin, T Thymin]

Restriktionsenzym	Erkennungs-/Spaltstelle	Reaktionstemperatur-optimum	Ursprungsorganismus
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	37 °C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
<i>Eco</i> RI	G/AATTC	37 °C	<i>Escherichia coli</i> RY 13
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	37 °C	<i>Haemophilus influenzae</i>

## 2.10 Nachweis der sekundären Endosymbionten von *B. tabaci*

Zum Nachweis der sekundären Endosymbionten, wurde aus jeweils 20 einzelnen Männchen und Weibchen von *B. tabaci* die DNA extrahiert (s. Punkt 2.6.4) und in einer PCR untersucht. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

**Tabelle 2.3: PCR Primer zum Nachweis der sekundären Endosymbionten von *B. tabaci*.**

Symbiont Zielgen	Name der Primer	Sequenz (5' → 3')	Annealing Temperatur/ Produktgröße	Referenz
<i>Arsenophonus</i> 23S rDNA	Ars23S-1 Ars23S-2	CGTTTGATGAATTCATAGTCAAA GGTCCCTCCAGTTAGTGTTACCCAAC	60 °C/ ~600 bp	Thao und Baumann, 2004a
<i>Hamiltonella</i> 16S rDNA	Ham-F Ham-R	TGAGTAAAGTCTGGAATCTGG AGTTCAAGACCGCAACCTC	60 °C/ ~700 bp	Zchori-Fein & Brown, 2002
<i>Cardinium</i> 16S rDNA	CFB-F CFB-R	GCGGTGTAAAATGAGCGTG ACCTMTTCTTAACTCAAGCCT	58 °C/ ~400 bp	Weeks <i>et al.</i> , 2003
<i>Fritschea</i> 23S rDNA	U23F 23S1GR	GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAGGA TGGCTCATCATGCAAAGGCA	60 °C/ ~600 bp	Everett <i>et al.</i> , 2005
<i>Rickettsia</i> 16S rDNA	Rb-F Rb-R	GCTCAGAACGAACGCTATC GAAGGAAAGCATCTCTGC	60 °C/ ~900 bp	Gottlieb <i>et al.</i> , 2006
<i>Wolbachia</i> 16S rDNA	Wol16S-F Wol16S-R	CGGGGGAAAAATTTATTGCT AGCTGTAATACAGAAAGTAAA	55 °C/ ~700 bp	Heddi <i>et al.</i> , 1999

Einfacher Reaktionsansatz:

13,75	µl	ddH <sub>2</sub> O	} Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA
2,5	µl	10x PCR Puffer	
0,5	µl	dNTPs [10 mmol/l]	
0,75	µl	Magnesiumchlorid [50 mmol/l]	
0,5	µl	Taq-Polymerase rec. [500 u/ml]	
1	µl	Primer <i>sense</i> [10 mmol/l]	
1	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 mmol/l]	
5	µl	<u>DNA</u>	
25	µl		

Programm der PCR-Maschine (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland):

95 °C	3 min	
95 °C	1 min	} 35 Zyklen
Annealing	1 min	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

Je 5 µl der PCR-Produkte wurden in 1%igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt (s. Punkt 2.7).

## 2.11 Kontroll-PCR für WmCSV A und WmCSV B

Zum eindeutigen Nachweis der zwei Genomkomponenten des *Watermelon chlorotic stunt virus* in Wirtspflanzen, sowie in Weiße Fliegen, wurden spezifische Primer mithilfe des Programms *Vector NTI Advance 10.0* (InforMax, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien, USA) generiert. Alle verwendeten Primer (Tab. 2.4) wurden von der Eurofins MWG GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. Nach der jeweiligen Reaktion wurden 5 µl der Amplifikate in ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zu erwarten war jeweils eine Bande mit Amplifikaten in der Größe von 567 bp (WmCSV A) und 493 bp (WmCSV B).

Einfacher Reaktionsansatz für WmCSV A:

2,5	µl	10x Puffer	} Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, Kalifornien, USA
1,25	µl	Magnesiumchlorid [50 µmol/l]	
0,5	µl	dNTPs [10 µmol/l]	
0,25	µl	Taq-Polymerase rec. [500u/ml]	
0,5	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]:	WmCSV_A_313_CP_s
0,5	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]:	WmCSV_A_880_CP_c
17,5	µl	ddH <sub>2</sub> O	
<u>2</u>	<u>µl</u>	<u>DNA</u>	
25	µl		

Einfacher Reaktionsansatz für WmCSV B:

2,5	μl	10x Puffer	} Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, Kalifornien, USA
1,25	μl	Magnesiumchlorid [50 μmol/l]	
0,5	μl	dNTPs [10 μmol/l]	
0,25	μl	<i>Taq</i> -Polymerase rec. [500u/ml]	
0,5	μl	Primer <i>sense</i> [10 μmol/l]:	WmCSV_B_531_BV1_s
0,5	μl	Primer <i>anti-sense</i> [10 μmol/l]:	WmCSV_B_1024_BV1_as
17,5	μl	ddH <sub>2</sub> O	
<u>2</u>	<u>μl</u>	<u>DNA</u>	
25	μl		

Programm der PCR-Maschine (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland):

95 °C	3 min	} 30 Zyklen
95 °C	1 min	
65 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	
10 °C	∞	

**Tabelle 2.4: Primer für die PCR zum Nachweis von WmCSV und TYLCV.** A Adenin, C Cytosin, G Guanin, M Adenin oder Cytosin, R Purine, T Thymin, Y Pyrimidine

	Name	Sequenz
Primer zum Nachweis von WmCSV A		
	WmCSV_A_313_CP_s	5'-ATGGCGAAGCGAACAGGAGATAT-3'
	WmCSV_A_880_CP_c	5'-CGACCACGGTGGCATGAAACTTTC-3'
Primer zum Nachweis von WmCSV B		
	WmCSV_B_531_BV1_s	5'-ATGCGTCGCTATGATGGGACACC-3'
	WmCSV_B_1024_BV1_as	5'-GACGCTGATTTTCCTTCACTCGT-3'
Primer zum Nachweis von TYLCV		
	TY1(+)	5'-GCCCATGTAYCGRAAGCC-3'
	TY2(-)	5'-GGRTTAGARGCATGMGTAC-3'

## 2.12 Kontroll-PCR für TYLCV

Die PCR zum spezifischen Nachweis des *Tomato yellow leaf curl virus* aus Israel wurde nach der Methode von Accotto *et al.* (2000) durchgeführt. Die Reaktion war anwendbar sowohl für DNA aus Wirtspflanzen, als auch für DNA aus Weiße Fliegen. Die Primer sind in Tabelle 2.4 angegeben. Zu erwarten war jeweils eine Bande im Agarosegel mit Amplifikaten in der Größe von 578 bp.

## Einfacher Reaktionsansatz:

5	μl	10 x Puffer	} Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, Kalifornien, USA
2,5	μl	Magnesiumchlorid [50 mmol/l]	
1	μl	<i>Taq</i> -Polymerase rec. [500u/ml]	
1	μl	dNTPs [10 μmol/l]	
1	μl	Primer <i>sense</i> [10 μmol/l]:	Ty1(+)
1	μl	Primer <i>anti-sense</i> [10 μmol/l]:	Ty2(-)
36,5	μl	ddH <sub>2</sub> O	
<u>2</u>	<u>μl</u>	<u>DNA</u>	
50	μl		

## Programm der PCR-Maschine (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland):

95 °C	3 min	} 30 Zyklen
95 °C	1 min	
55 °C	30 s	
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	
10 °C	∞	

**2.13 Real-time PCR zur Quantifizierung von WmCSV und TYLCV**

Die quantitative *real-time* Polymerase Kettenreaktion (qPCR) ist ein molekularbiologisches Verfahren zur Amplifikation von kleinen DNA-Fragmenten bei gleichzeitiger Mengenbestimmung des Amplifikats im Fortlauf der Reaktion. Anhand eines Vergleichs mit einer Standardreihe bzw. eines Referenzgens, kann der ursprüngliche absolute bzw. relative Ausgangsgehalt des DNA-Fragments in der zu untersuchenden Probe berechnet werden. Zur Messung der Amplifikatmenge können zum einen fluoreszierende DNA-Sonden (FRET-Sonden), zum anderen interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.

FRET-Sonden, wie zum Beispiel die TaqMan-Sonden (TaqMan, Roche Molecular Systems Inc., Kalifornien, USA), lagern sich zwischen die Primer an die Matrizen-DNA an. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase werden die Sonden abgebaut und sind somit, aufgrund ihrer Struktur und Eigenschaften, in der Lage ein Fluoreszenzsignal auszusenden. Interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie zum Beispiel SYBR Green I (Molecular Probes Inc., Oregon, USA), lagern sich in doppelsträngige DNA ein und sind in diesem Fall in der Lage ein Fluoreszenzsignal

auszusenden. Die Messung der Fluoreszenz findet am Ende der Elongation eines jeden Zyklus statt.

Wie bei einer herkömmlichen PCR wird auch bei der qPCR in jedem Zyklus die zu amplifizierende DNA verdoppelt. Somit nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende der Gesamtreaktion wird anhand der erhaltenen Fluoreszenzsignale die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR ist eine korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen (Bustin *et al.*, 2009; Förster, 1948; Mackay, 2004; Zipper *et al.*, 2004).

Alle *real-time* Reaktionen wurden in der *real-time* PCR-Maschine *Mastercycler ep realplex<sup>4</sup>* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt, unter Verwendung von transparenten Platten (*Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate*, Applied Biosystems, Wilmington, USA), sowie den zugehörigen lichtdurchlässigen Abdichtfolien (*Optical Adhesive Covers*, Applied Biosystems; Wilmington, USA). Die Primer und TaqMan-Sonden (Tab. 2.5) wurden mittels *Beacon Designer* (PREMIER Biosoft International, Palo Alto CA, USA) designt, von der Eurofins-MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mittels der *realplex<sup>4</sup>* Software (Eppendorf; Hamburg, Deutschland), *Microsoft Office Excel* (Microsoft; Redmond, USA) und SigmaPlot 9.0 (SYSTAT software; Point Richmond, USA).

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Versuche in drei Wiederholungen bzw. mehreren Parallelen (biologische Repliken) durchgeführt. Jede Parallele wurde in der qPCR einer Doppelbestimmung unterzogen (technische Parallele). Die statistische Signifikanz der Mengenverhältnisse an quantifizierten Viren wurde mit dem t-Test ermittelt. Die Signifikanzschranken wurden zu jeder Seite der Normalverteilung mit 0,025 festgelegt. Das Signifikanzniveau liegt somit bei  $\alpha = 5\%$ . Zur Kontrolle des t-Tests wurde der Mann-und-Whitney-Test (U-Test) durchgeführt (Lozán und Kausch, 2004).

**Tabelle 2.5: Primer und Sonden für die qPCR zur Quantifizierung von WmCSV, TYLCV, FBNSV, sowie 18S DNA, *hsp70* cDNA und  $\beta$ -Aktin cDNA aus *B. tabaci*.** Sonden sind mit Modifikation angegeben.

Name	Sequenz
Primer zum Nachweis von WmCSV A	
WmCSV_ATaqsense224	5'-GTACTTGCAGGCCGTTGAATC-3'
WmCSV_ATaganti35	5'-AAACGGGAGTGGAAATGAGAATATC-3'
Primer zum Nachweis von WmCSV B	
WmCSV_BTaqs	5'-GTCTACGGCATTCCACGAGTG-3'
WmCSV_BTaganti	5'-CTGAGGTTCTTCGCAAAGTAAAG-3'
TaqMan Sonde für die A Komponente	
WmCSV_A_pr	FAM-5'-CCTGTTGCTTCGCCATAATCACGG-3'-TAMRA
TaqMan Sonde für die B Komponente	
WmCSV_BTaqprobe	FAM-5'-CACCGCACTATCGTCACCGCTG-3'-TAMRA
Primer zum Nachweis von TYLCV	
TYLCV_Q_F2	5'-CGCCCGCCTCGAAGGTTC-3'
TYLCV_Q_R2	5'-TCGTCGCTTGTTTGTGCCTTG-3'
TaqMan Sonde zum Nachweis von TYLCV	
TYLCV_Probe	VIC-5'-CGACAGCCCATACAGCAGCCGTG-3'-TAMRA
Primer zum Nachweis von 18S DNA aus <i>B. tabaci</i> (Gil-Salas <i>et al.</i> , 2007)	
Bemisia-3F	5'-AAGGATCATTGTGCGAACTCGA-3'
Bemisia-65R	5'-CCTGTGTCCCGCGGG-3'
TaqMan Sonde zum Nachweis von 18S DNA aus <i>B. tabaci</i> (Gil-Salas <i>et al.</i> , 2007)	
Bemisia-27T	FAM-5'-AAGGTCTATCCGACCCCGAGCCG-3'-TAMRA
Primer zum Nachweis von FBNSV	
FBNY69_sybrs	5'-AGGTATTGTTCTGCTAATCAT-3'
FBNY69_sybrc	5'-GGCTTCCATTGTCTTCTT-3'
Primer zum Nachweis der cDNA von <i>hsp70</i> (Yu und Wan, 2009)	
hsp70_Bt_s	5'-TTCCCGAGTCGGACAAACAG-3'
hsp70_Bt_c	5'-CCTCCTGGAGCTTGTAGTCGAA-3'
Primer zum Nachweis der cDNA von $\beta$ -Aktin (Yu und Wan, 2009)	
aktin_Bt_s	5'-TCACCACCACAGCTGAGAGA-3'
aktin_Bt_c	5'-CTCGTGGATACCGCAAGATT-3'

### 2.13.1 Quantifizierung der A-Komponente von WmCSV

#### Mit TaqMan Sonde

Einfacher Reaktionsansatz:

12,5	µl	Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)	
0,3	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]:	WmCSV_ATaqsense224
0,3	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]:	WmCSV_ATaganti35
0,3	µl	Sonde [10 µmol/l]:	WmCSV_A_pr
6,6	µl	ddH <sub>2</sub> O	
<u>5,0</u>	<u>µl</u>	<u>DNA</u>	
25	µl		

Programm der PCR-Maschine:

50°C	3 min	
95 °C	5 min	
95 °C	20 s	} 42 Zyklen
54 °C	30 s	
60 °C	30 s	

#### Mit SYBR-Green

Einfacher Reaktionsansatz:

12,5	µl	KAPA SYBR FAST QPCR Master Mix Universal (PEQLAB, Erlangen, Deutschland)	
0,3	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]:	WmCSV_ATaqsense224
0,3	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]:	WmCSV_ATaganti35
6,9	µl	ddH <sub>2</sub> O	
<u>5,0</u>	<u>µl</u>	<u>DNA</u>	
25	µl		

Programm der PCR-Maschine:

95 °C	5 min	
95 °C	20 s	} 42 Zyklen
54 °C	30 s	
60 °C	30 s	

### 2.13.2 Quantifizierung der B-Komponente von WmCSV

#### Mit TaqMan Sonde

Einfacher Reaktionsansatz:

12,5	µl	Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)	
0,5	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]:	WmCSV_ BTaqs
0,5	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]:	WmCSV_ BTaqanti
0,5	µl	Sonde [10 µmol/l]:	WmCSV_BTaqprobe
6,0	µl	ddH <sub>2</sub> O	
<u>5,0</u>	<u>µl</u>	<u>DNA</u>	
25	µl		

Programm der PCR-Maschine:

50°C	3 min	
95 °C	5 min	
95 °C	15 s	} 42 Zyklen
60 °C	60 s	

### 2.13.3 Quantifizierung von TYLCV

#### Mit TaqMan Sonde

Einfacher Reaktionsansatz:

12,5	µl	Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)	
1	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]:	TYLCV_Q_F2
1	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]:	TYLCV_Q_R2
0,75	µl	Sonde [10 µmol/l]:	TYLCV_Probe
0,75	µl	Magnesiumchlorid [50 µmol/l]	
4	µl	ddH <sub>2</sub> O	
<u>5</u>	<u>µl</u>	<u>DNA</u>	
25	µl		



Programm der PCR-Maschine:

50 °C	3 min	
95 °C	5 min	
95 °C	15 s	} 42 Zyklen
60 °C	60 s	

Mit SYBR-Green

Einfacher Reaktionsansatz:

12,5	µl	KAPA SYBR FAST QPCR Master Mix Universal (PEQLAB, Erlangen, Deutschland)
1	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]: TYLCV_Q_F2
1	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]: TYLCV_Q_R2
5,5	µl	ddH <sub>2</sub> O
<u>5</u>	<u>µl</u>	<u>DNA</u>
25	µl	

Programm der PCR-Maschine:

95 °C	5 min	
95 °C	15 s	} 42 Zyklen
60 °C	60 s	

#### 2.13.4 Standardreihen WmCSV A und B, sowie TYLCV

Für eine absolute Quantifizierung von WmCSV bzw. TYLCV Genomen ist eine Standardkurve nötig, anhand derer die Menge an Viren in der zu untersuchenden Probe berechnet wird. Um eine Standardkurve zu erhalten, wurden *Escherichia coli* Zellen mit WmCSV bzw. TYLCV Genomen, welche sich im Plasmid pBin19 bzw. pCGN1547 befanden, transformiert (s. Punkt 2.8.2, 3.8.3 und 2.9). Anschließend wurden in je 3 Parallelen Plasmidaufreinigungen durchgeführt (s. Punkt 2.6.8) und je eine 10-fach Verdünnungsreihe angefertigt. Die DNA in den Verdünnungsreihen diente als Matrize in der qPCR. Die Standardkurve je Parallele ergab sich aus der linearen, umgekehrt proportionalen Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten DNA-Mengen und den C<sub>q</sub>-Werten der qPCR. Der C<sub>q</sub>-Wert beschreibt dabei den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Die Differenz zwischen den C<sub>q</sub>-Werten der einzelnen Verdünnungsschritte beträgt bei 10-facher Verdünnung 3,322 Zyklen

(Anstieg der Geraden = 3,322). Zur Kontrolle der Spezifität der Primer, wurden je 10 µl der qPCR-Produkte in ein 2%iges Agarosegel aufgetragen.

#### Berechnung der DNA-Mengen in der Verdünnungsreihe

Molare Masse ( $M$ ) eines desoxy-Nukleotids (nt):

$$M_{nt} = 325 \text{ g/mol (Durchschnitt aus } M \text{ von dAMP, dGMP, dCMP, dTMP)}$$

Molarität:

$$1 \text{ mol} = 6,02214179 \times 10^{27} \text{ Teilchen (Avogadro-Konstante)}$$

$$1 \text{ Teilchen entspricht } 1 \text{ nt}$$

Masse ( $m$ ) eines desoxy-Nukleotids:

$$1 \text{ nt} = 5,3967511 \times 10^{-22} \text{ g}$$

Masse eines Daltons:  $1 \text{ Da} = 1,660538782 \times 10^{-27} \text{ kg}$

Masse ( $m$ ) eines desoxy-Nukleotids in Dalton:

$$m = 325 \text{ Da}$$

→ Masse eines Basenpaares:

$$1 \text{ bp} = 650 \text{ Da}$$

Größe von WmCSV A: 2753 bp

Größe von WmCSV B ca. 2750 bp

Größe von pBin19: 11777 bp

Größe von TYLCV: 2793 bp

Größe von pCGN1647: 14440 bp

WmCSV A und B liegen jeweils als Monomere im binären Vektor pBin19 und TYLCV liegt als Dimer im binären Vektor pCGN1547 vor (Navot *et al.*, 1991).

Größe des Konstrukts (pBin19 + WmCSV A): 14530 bp

Größe des Konstrukts (pBin19 + WmCSV B): ca. 14527 bp

Größe des Konstrukts (pCGN1547 + 2xTYLCV): 20026 bp

Berechnung der Masse des Konstrukts am Beispiel von WmCSV A + pBin19 in ng (y)

$$x = \frac{14530 \text{ bp} \times 650 \text{ Da}}{1 \text{ bp}}$$

$$x = 9444500 \text{ Da}$$

$$y = \frac{9444500 \text{ Da} \times 1,660538782 \times 10^{-27} \text{ kg}}{1 \text{ Da}}$$

$$y = 1,568296 \times 10^{-20} \text{ kg}$$

$$y = 1,568296 \times 10^{-8} \text{ ng}$$

Molekülzahl (z) in der Standardreihe

Extrahierte Plasmid-DNA (Vektor+WmCSV A) wird mittels Nano-Drop gemessen. Der Messwert (a) wird direkt in die Berechnung eingeführt.

$$z (\text{WmCSV A}) = \frac{a \text{ ng/}\mu\text{l (Nano-Drop)}}{1,568296 \times 10^{-8} \text{ ng}}$$

Beispiel:

NanoDrop Messung: a = 50 ng/μl (aus 100 Weiße Fliegen)

$$z (\text{WmCSV A}) = \frac{50 \text{ ng/}\mu\text{l}}{1,568296 \times 10^{-8} \text{ ng}}$$

$$z = 3,188174 \times 10^9 / \mu\text{l}$$

Die erste Stufe der Verdünnung enthält im Beispiel rund  $3,188 \times 10^9$  WmCSV A-Moleküle je μl. Es wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe angefertigt. Die zweite Verdünnungsstufe enthielt somit  $3,188 \times 10^8$  Moleküle. In der Regel wurden 6 bis 7 Verdünnungsstufen, im Bereich von ca.  $10^9$  bis ca.  $10^2$  Molekülen, eingesetzt, um eine Standardkurve zu erstellen. Um eine ökonomisch sinnvolle Durchführung der qPCR zu gewährleisten, wurden häufig die ersten zwei Stufen der Verdünnung nicht in die Reaktion eingebracht, da ihre DNA-Konzentration viel zu hoch im Vergleich zu den

Gehalten in den zu untersuchenden Proben waren. Um Pipettierfehler gering zu halten, wurde zusätzlich je eine 5-fach Verdünnung hergestellt und entsprechend 5 µl in die Reaktion eingebracht.

Analog wurde das gleiche Verfahren zur Erstellung einer Standardkurve für WmCSV B bzw. TYLCV angewandt.

Eine angefertigte Standardreihe, die effizient eine Standardkurve mit einem Anstieg von ca. 3,322 liefert, sollte für möglichst alle Versuche verwandt werden, die miteinander verglichen werden sollen. Dies verringert Fehler, die durch Mengenschwankungen zwischen verschiedenen Plasmidaufreinigungen entstehen können. Wird eine neue Plasmidaufreinigung angefertigt, um eine aufgebrauchte Standardreihe zu ergänzen, muss sichergestellt werden, dass die neue Standardkurve die gleichen Ergebnisse liefert, wie die bisher verwandte.

Um den Fehler zu bestimmen, der während einer solchen Ergänzung auftritt, wurden mehrere Verdünnungsreihen für WmCSV-A und TYLCV aus aufgereinigten Plasmiden hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden in die qPCR eingesetzt. Mit Hilfe der *realplex*<sup>4</sup> Software (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden aus den gemessenen Daten Standardreihen und Standardkurven erstellt und verglichen. Dabei wurde kalkuliert, inwiefern sich verschiedene Plasmidaufreinigungen in der Quantifizierung unterscheiden. Somit konnten Aussagen zur Robustheit der Methode, sowie zur Reproduzierbarkeit getroffen werden.

#### **2.13.5 Quantifizierung und Vergleich von A- und B-Komponente von WmCSV hinsichtlich ihres Verhältnisses**

Da nicht bekannt war, in welchem Verhältnis die A- und B-Komponente von WmCSV in infizierten Wirtspflanzen vorliegen, musste dieses bestimmt werden, um in nachfolgenden Quantifizierungen, die nur mit einer Komponente durchgeführt wurden, korrekte Aussagen zur Virusmenge treffen zu können. Dazu wurden für die A- und B-Komponente von WmCSV, welche sich im Vektor pBin19 befanden (s. Punkt 2.13.4), jeweils 10-fach Verdünnungsreihen angefertigt und jeweils die erste Stufe der Verdünnung auf  $1 \times 10^9$  Moleküle pro µl eingestellt. Je Viruskomponente wurde je 1 µl DNA aus infizierten symptomatischen und 1 µl aus virusfreien Wassermelonen in 3 biologischen Parallelen und 2 technischen Parallelen in die qPCR eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit TaqMan Sonden durchgeführt (s. Punkt 2.13.1 und 2.13.2). Anhand der Verhältnisse von Standardreihen und Cq-Werten der Pflanzenproben, konnte auf das Verhältnis der Viruskomponenten geschlossen werden.

### Anmerkung

Die hier verwendeten Verdünnungsreihen weichen aufgrund ihrer genauen Einstellung, auf  $1 \times 10^9$  Moleküle in der ersten Stufe, von den in anderen Versuchen verwendeten Standardreihen ab. Auf die Standardkurve hat dies keinen Einfluss. Unterschiede in den Standardkurven resultieren aus Pipettierungenauigkeiten, sowie Schwankungen zwischen Plasmidaufreinigungen (s. Punkt 2.13.4).

### **2.13.6 Quantifizierung mit DNA aus Wirtspflanzen und Weiße Fliegen**

Von der DNA, die aus vereinten Weiße Fliegen oder Wirtspflanzen extrahiert wurde, wurde die Reinheit und Konzentration über die spezifische Lichtabsorption bei 260 nm bestimmt (NanoDrop *Spectrophotometer* ND-1000, PEQLAB, Erlangen, Deutschland). Anschließend wurde die DNA auf Konzentrationswerte zwischen 20 - 50 ng/µl eingestellt und dann 1:5 verdünnt. 5 µl der Verdünnung wurden in die qPCR eingesetzt, wodurch der Pipettierfehler verringert wurde.

Die Gewebeextrakte, die bei der Extraktion aus Einzelindividuen gewonnen wurden (s. Punkt 2.6.4), wurden ebenfalls 1:5 verdünnt und mit 5 µl in die qPCR eingebracht (s. Punkt 2.13.1 bzw. Punkt 2.13.3). Für die Berechnung der Virusgehalte pro Individuum, wurden hypothetische Individuen angenommen, die 100 ng DNA in ihrem Organismus enthalten (s. Anhang 6.4).

Um eine übersichtliche graphische Darstellung der Daten zu gewährleisten, wurden Mediane, Mittelwerte und Standardabweichungen von logarithmierten Einzelwerten, in die jeweiligen Diagramme eingetragen.

### **2.13.7 Quantifizierung von WmCSV A und TYLCV in isolierten Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen**

Mitteldärme und primäre Speicheldrüsen, wurden wie unter Punkt 2.4 beschrieben isoliert. Vor dem Ansetzen der quantitativen PCR (s. Punkt 2.13.1 bzw. 2.13.3 [TaqMan]), wurden die Zellen des Mitteldarms und der Speicheldrüsen für 6 min bei 95°C aufgeschlossen. Der Ansatz wurde durch mehrmaliges Auf- und Ab-Pipettieren gemischt und auf 2 Reaktionen zu je 5 µl aufgeteilt. Durch diese Aufteilung wurden, wie in einer Doppelbestimmung, zwei Cq-Werte erhalten. Bei annähernd gleichen Cq-Werten konnte geschlossen werden, dass der Zellaufschluss vor der Reaktion vollständig war. Die Quantifizierungen aus einzelnen Mitteldärmen, wurden in 3 Wiederholungen, mit insgesamt 36 Parallelen durchgeführt (n = 36).

Für die Quantifizierung aus primären Speicheldrüsen, wurden 4 Wiederholungen mit jeweils 5 Parallelen durchgeführt ( $n = 20$ ). Jede Parallele enthielt 10 vereinte Speicheldrüsen. Dadurch wurde gewährleistet, dass auch geringe Virusmengen pro durchschnittlicher Speicheldrüse, noch eindeutig detektiert werden konnten.

### 2.13.8 Relative Quantifizierung von WmCSV A bzw. TYLCV aus Hämolymphe

Da das Volumen der extrahierten Hämolymphe von *B. tabaci* nicht (mit den zur Verfügung stehenden Mitteln) bestimmt und die Hämolymphe nicht vollständig extrahiert werden konnte, wurde eine relative qPCR zur Quantifizierung von WmCSV bzw. TYLCV durchgeführt. Dazu war ein Referenzgen (interne Kontrolle) notwendig, dessen Signal verwendet wurde, um die Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten DNA (Hämolymphe) auszugleichen. Für die relative Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus Hämolymphe, wurde in dieser Arbeit die 18S DNA von *B. tabaci* als Referenzgen herangezogen. Primer- und Sondensequenzen zum Nachweis der 18S DNA (Tab. 2.5) wurden Gil-Salas *et al.* (2007) entnommen.

Je Reaktion wurde die Hämolymphe von fünf Weibchen vereint, um eine für die qPCR adäquate Konzentration zu erreichen. Das Mineralöl-Hämolymphe-Gemisch wurde 6 min bei 95 °C inkubiert, bevor es als Matrizenträger unverdünnt zu jeweils 5 µl in die *real-time* PCR eingefügt wurde (s. Punkt 2.13.1 bzw. 2.13.3 [TaqMan]). Das Mineralöl hatte keinen Einfluss auf die Reaktion.

Einfacher Reaktionsansatz zum Nachweis von 18S DNA aus *B. tabaci*:

12,5	µl	Maxima Probe/ROX qPCR Master Mix (Fermentas; St. Leon-Rot, Deutschland)	
1,4	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]:	Bemisia-3F
1,4	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]:	Bemisia-65R
1,4	µl	Sonde [10 µmol/l]:	Bemisia-27T
3,3	µl	ddH <sub>2</sub> O	
<u>5,0</u>	<u>µl</u>	<u>DNA (Hämolymphe in Mineralöl)</u>	
25	µl		

Programm der PCR-Maschine:

50°C	3 min	
95 °C	5 min	
95 °C	15 s	} 42 Zyklen
60 °C	60 s	

Berechnet wurden  $\Delta Cq$ -Werte als Differenz zwischen den  $Cq$ -Werten der Virus-Amplifikation und den  $Cq$ -Werten der 18S DNA-Amplifikation. Die  $Cq$ -Werte für 18S DNA lagen durchschnittlich bei rund 25 Zyklen.

$$\Delta Cq = Cq_{\text{Virus}} - Cq_{18S \text{ DNA}}$$

Zur sinnvollen graphischen Darstellung der Ergebnisse, wurden Mittelwerte von reziproken  $\Delta Cq$ -Einzelwerten, mehrerer biologischer Parallelen, in ein Säulendiagramm aufgetragen, da so ein höherer Virusgehalt auch durch einen höheren Mittelwert angezeigt wird. Die Faktoren in denen der Anstieg des Virusgehalts bzw. das Verhältnis zu anderen Populationen angegeben ist, wurde nach der  $\Delta\Delta Cq$ -Methode und der Formel  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  ermittelt (Cai *et al.*, 2005).

Die Darstellung von reziproken Werten hat zur Folge, dass Unterschiede zwischen den Viren ebenfalls reziprok erscheinen. Obwohl somit für jedes Virus die höheren relativen Molekülzahlen durch höhere reziproke Werte angezeigt werden, zeigt ein Vergleich zwischen den Viren ein anderes Bild. Die WmCSV-Proben haben hier durchschnittlich die kleineren Werte, obwohl mehr Viren enthalten sind, als in den TYLCV-Proben. Um das Verhältnis zwischen den Viren zu ermitteln, müssen daher die  $\Delta Cq$ -Werte betrachtet werden und nicht die graphische Darstellung. Zusätzlich muss beachtet werden, dass obwohl die Effizienzen der Reaktionen im Durchschnitt annähernd gleich sind, die Effizienzen der Primer zur Quantifizierung von WmCSV und TYLCV jedoch sehr unterschiedlich sind. Die Fluoreszenzkurven der WmCSV-Amplifikation schneiden den Schwellenwert später, als jene der TYLCV-Amplifikation, bei gleicher eingesetzter Molekülzahl (Vergleiche die Mittelwerte der  $Cq$ -Werte in Tab. 6.1). Auf absolute Quantifizierungen hat dieser Umstand keine Auswirkungen, da sich die Primereffizienz bei Standardreihe und Proben gleich verhält. Ein Vergleich von WmCSV und TYLCV ist daher in diesen Fällen direkt möglich. Bei einer relativen Quantifizierung wird jedoch der Bezug zu einer spezifischen Standardreihe durch ein universell verwendbares Referenzgen ersetzt. Die geringere Effizienz der WmCSV-Primer macht hier einen direkten Vergleich zur relativen TYLCV-Quantifizierung unmöglich. Da bei gleicher eingesetzter Molekülzahl in der absoluten Quantifizierung, die Fluoreszenzsignale der WmCSV-Amplifikation später kommen als die TYLCV-Signale, ist der tatsächliche Gehalt an WmCSV in der Hämolymphe höher, als es eine direkte Berechnung nach der  $\Delta\Delta Cq$ -Methode angeben würde. Um aber dennoch das Verhältnis zwischen WmCSV und TYLCV angeben zu können, wurde nach folgenden Verfahren die WmCSV-Quantifizierung auf die TYLCV-Quantifizierung normiert.

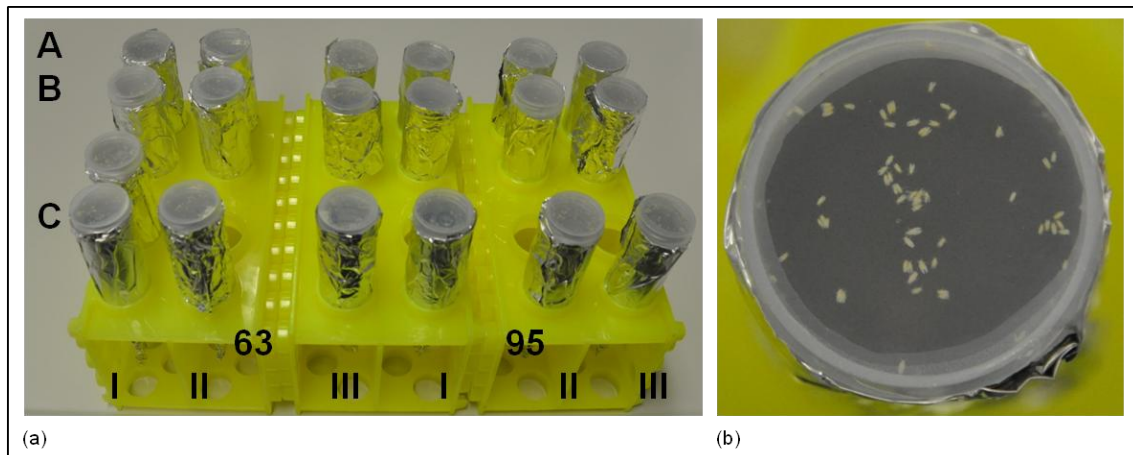
In Tabelle 6.1 sind die Differenzen zwischen den Mittelwerten der Cq-Werte der Standardreihen von WmCSV und TYLCV angegeben. Die durchschnittliche Differenz der Cq-Werte beträgt  $6,64 \pm 0,25$ . Diese Differenz gibt die Verschiebung zwischen den Schnittpunkten der Fluoreszenzkurven mit dem *Threshold* an, die bei jeder Quantifizierung von gleichen Molekülzahlen zwischen WmCSV und TYLCV auftritt. (Daher war es erforderlich auch bei relativen Quantifizierungen die jeweilige Standardreihe mitlaufen zu lassen.) Die Differenz wird nun vom  $\Delta Cq$ -Wert der relativen Quantifizierung von WmCSV subtrahiert. Das Ergebnis ist eine neue Differenz ( $\Delta Cq_2$ ), die den  $\Delta Cq$ -Wert der Fluoreszenzkurven angibt, wenn sich die WmCSV-Quantifizierung genau so verhalten würde, wie die TYLCV-Quantifizierung. Zwischen  $\Delta Cq_2$  und dem  $\Delta Cq$ -Wert der relativen TYLCV-Quantifizierung wird die Differenz gebildet. Das Ergebnis ist  $\Delta\Delta Cq$ . Nach der Formel  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  erhält man den Faktor, in dem sich der WmCSV-Gehalt vom TYLCV-Gehalt in der Hämolymphe unterscheidet. Aufgrund der Standardabweichungen, die alle eingesetzten Werte besitzen, ist der berechnete Faktor kein absoluter Wert.

#### 2.14 Virusaufnahme aus artifiziellem Medium

Um zu bestätigen, dass in Weiße Fliegen Unterschiede in den Mengen von WmCSV und TYLCV auf Konzentrationsunterschiede in Wassermelonen und Tomaten zurückzuführen sind, wurde untersucht, ob gefütterte gleiche Konzentrationen von WmCSV und TYLCV auch gleichhohe Viruskonzentrationen in den Weiße Fliegen hervorrufen.

Dazu wurden je Virus 3-mal ca. 60 virusfreie Individuen von den *B. tabaci* Populationen 63 und 95 in drei Falcon-Röhrchen (50 ml, BD Bioscience, San Jose, Kalifornien, USA) überführt und für 42 Stunden im Gewächshaus inkubiert (hell/dunkel, 16 h/8 h, 24 °C/18 °C). Jedes Falcon-Röhrchen war mit zwei straff gespannten Parafilmstücken (Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA) verschlossen. Zwischen den Parafilmen befanden sich jeweils 300 µl einer Saccharoselösung, die mit einer Virusaufreinigung versetzt war. Da sich die Weiße Fliegen vorzugsweise zum Licht (Parafilm) begeben, wurden die Falcon-Röhrchen an der Zylindermantelfläche und an der Unterseite mit Aluminiumfolie lichtdicht umschlossen (Abb. 2.3). Die Weiße Fliegen waren in der Lage mit ihrem Stilett den Parafilm zu durchdringen und sich von der Saccharoselösung zu ernähren. Dabei nahmen sie auch die Viren mit auf, die darin suspendiert waren.





**Abbildung 2.3: Künstliche Fütterung von *B. tabaci* mit Saccharoselösung.** (a) Fütterung von Population 63 und 95 mit WmCSV (I), TYLCV (II) und virusfreier Saccharoselösung (III) in je 3 Parallelen (A, B, C). (b) Detailansicht der Parafilm-Doppelmembran mit Saccharoselösung. An der inneren Membran sitzen die Weiße Fliegen, die sich von der Saccharoselösung ernähren.

Nach Ablauf von 42 Stunden wurden die Weiße Fliegen zur Dekontamination des Verdauungstraktlumens, für 2 Tage auf Nicht-Wirtspflanzen (Baumwolle) übergesetzt. Anschließend wurde für jedes Virus aus je vier Individuen der drei Parallelen die DNA isoliert (s. Punkt 2.6.4) und 1 µl in eine qPCR zur Quantifizierung der Viren eingebracht (s. Punkt 2.13). Ebenso wurden die Virusmengen in den Saccharoselösungen quantifiziert. Nach der Quantifizierung wurden anhand der Viruskonzentrationen in den Saccharoselösungen die Mengen an WmCSV und TYLCV in ganzen Individuen berechnet.

Obwohl für beide Viren eine Konzentration von jeweils 300 µg/ml eingestellt wurde, war der in der qPCR ermittelte jeweilige Virusgehalt der Saccharoselösungen verschieden. Dies lag an Proteinverunreinigungen, die bei Virusaufreinigungen auftreten und bei jeder Aufreinigung unterschiedlich stark die Probe kontaminieren und somit die OD-Messung verfälschen. Daher mussten nach der Quantifizierung die erhaltenen Einzelwerte für die Weiße Fliegen einer mathematischen Normierung unterzogen werden. Normiert wurde auf den Wert der WmCSV Konzentration pro 1 µl Saccharoselösung ( $1,25 \times 10^8$  Viren/µl Saccharoselösung; Tab. 6.3).

#### Herstellen der Saccharoselösung mit gleicher Viruskonzentration

Mittels Photometer wurde der Titer zweier Virusaufreinigungen (WmCSV und TYLCV) bestimmt. Die Virusaufreinigungen wurden in 15%iger Saccharoselösung verdünnt und auf eine Endkonzentration von 300 µg/ml eingestellt. Zur genauen Quantifizierung der Viren in den Saccharoselösungen, wurden die Lösungen in eine qPCR eingebracht.

Zur Vermeidung einer Überladung der Reaktion mit Matrizen-DNA, wurden die Saccharoselösungen 1:100 verdünnt.

### **2.15 Menge der Virusaufnahme nach Hungerstress**

Um zu ergründen, ob die Unterschiede im Virusgehalt zwischen den Populationen 63 und 95 auf Unterschiede im Fressverhalten zurückzuführen sind, wurden jeweils drei bis fünf Tage alte, synchronisierte Weiße Fliegen für 6 Stunden einem Hungerstress ausgesetzt. Anschließend wurden die Insekten nach Populationen getrennt auf WmCSV infizierte Wassermelonen überführt. Nach 0, 1, 2 und 16 Stunden, sowie nach 5 Tagen wurden je Population 3-mal eine Gruppe von 100 Individuen, sowie je 2 einzelne Individuen abgesaugt und bei -80 °C aufbewahrt. Nach Probenahme des letzten Zeitpunktes wurde aus den Insekten die DNA extrahiert (s. Punkt 2.6.2 und 2.6.4). Anschließend wurde die DNA in eine qPCR eingebracht und der Virusgehalt bestimmt (s. Punkt 2.13).

### **2.16 Absolute Quantifizierung von WmCSV A und TYLCV in Individuen, Mitteldärmen und Speicheldrüsen von *B. tabaci***

Synchronisierte 3 bis 5 Tage alte Weiße Fliegen wurden für 5 Tage auf virusinfizierte symptomatische Wirtspflanzen transferiert. Anschließend wurden die Verdauungstrakte der Insekten für 2 Tage auf Nicht-Wirtspflanzen dekontaminiert. Danach wurden aus einzelnen Individuen, bzw. aus Gruppen von 100 Individuen, sowie aus den Wirtspflanzen auf denen die Insekten gesaugt hatten, die DNA isoliert (s. Punkt 2.6.4, 2.6.2 und 2.6.6) und je 5 µl in eine absolute qPCR zur Quantifizierung der Viren, eingesetzt (s. Punkt 2.13.6). Am Binokular wurden Mitteldärme und primäre Speicheldrüsen präpariert (s. Punkt 2.4) und dann ebenfalls in die qPCR zur Quantifizierung der Viren eingeführt (s. Punkt 2.13.7). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Boxplot Diagrammen, in denen die erhaltenen Quantifizierungsdaten für Mitteldärme als logarithmische Werte angegeben sind. Dadurch wurde eine übersichtliche Darstellung gewährleistet. Einzelwerte, die den Betrag Null aufweisen, wurden auch in der logarithmischen Darstellung Null gesetzt.

### **2.17 Relative Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Hämolymphe von *B. tabaci***

Drei bis fünf Tage alte Individuen von *B. tabaci* wurden einem Hungerstress von zwei Stunden ausgesetzt, bevor sie auf infizierte Wirtspflanzen übertragen wurden. Anschließend wurden zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8, 24 und 30 Stunden, sowie nach 6 Tagen jeweils einzelne Weiße Fliegen von den Wirtspflanzen gesammelt und die Hämolymphe isoliert (s. Punkt 2.5). Die relative Quantifizierung von WmCSV bzw. TYLCV wurde wie unter Punkt 2.13.8 beschreiben durchgeführt.

### **2.18 Viruskonzentration in Mitteldärmen und Hämolymphe nach Übertragen virustragender *B. tabaci* von infizierten Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen**

Mittels quantitativer *real-time* PCR wurde ermittelt, wie sich die Konzentrationen von WmCSV und TYLCV in Mitteldärmen und der Hämolymphe verhalten, wenn die infizierte Wirtspflanze durch eine Nicht-Wirtspflanze ersetzt wird.

Dazu wurden je Virus Weiße Fliegen der verschiedenen Populationen auf junge virusinfizierte symptomatische Wirtspflanzen überführt und für 4 Tage in einer Klimakammer inkubiert (s. Punkt 2.1). Anschließend wurden die Weiße Fliegen auf eine Nicht-Wirtspflanze (Baumwolle) überführt und eine Stichprobe von ca. 50 Individuen genommen (Zeitpunkt 0 d). Von dieser Stichprobe wurden 3-mal je 3 Mitteldärme aus Weibchen präpariert (s. Punkt 2.4), in 30 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20 °C gelagert. In einem parallelen Ansatz wurden aus jeweils 5 Weibchen, in 3 Parallelen, die Hämolymphe isoliert (s. Punkt 2.5) und ebenfalls bei -20 °C gelagert. Nach 24 Stunden (1 d) wurde die Baumwolle durch eine neue Baumwolle ausgetauscht und wiederum eine Stichprobe von 50 Individuen genommen. Nach weiteren 24 Stunden (2 d) wurde die Baumwolle erneut ausgetauscht und wiederum 3-mal je 3 Mitteldärme präpariert, bzw. Hämolymphe isoliert.

Zu den Zeitpunkten 4 d, 6 d, 8 d und 10 d wurden ebenfalls Stichproben entnommen und wie zuvor je 3-mal 3 Mitteldärme präpariert und bei -20 °C gelagert. Hämolymphe wurde nur am Tag 6 noch einmal isoliert. Ebenso wurden von der infizierten Wirtspflanze, sowie von den Baumwollpflanzen Blattproben genommen und mittels *DNeasy* die DNA extrahiert (s. Punkt 2.6.6).

In einer absoluten qPCR, wurde für die Zeitpunkte 0 d bis 10 d der jeweilige Virusgehalt der präparierten Mitteldärme bestimmt, ebenso in den genommenen

Blattproben. In einer relativen qPCR, wurde anhand von 18S ribosomaler DNA der relative Virusgehalt der Hämolymphe bestimmt (s. Punkt 2.13.8).

## **2.19 Virusgehalt in Nachkommen der virustragenden Weiße Fliegen**

Der nachfolgende Versuch beantwortet die Frage, ob es eine vertikale Übertragung der Viren von den adulten Tieren zu ihren Nachkommen gibt.

Dazu wurden je *B. tabaci* Population ca. 300 nicht synchronisierte Individuen für fünf Tage auf WmCSV bzw. TYLCV infizierte symptomatische Wirtspflanzen transferiert. Nach dieser Zeitperiode wurden die Insekten für einen Tag auf eine Nicht-Wirtspflanze transferiert (Baumwolle) und anschließend auf eine weitere. Nach weiteren 24 Stunden wurde die zweite Baumwolle durch eine dritte ausgetauscht. Somit wurde gewährleistet, dass die Blattoberflächen der dritten Baumwolle nicht übermäßig mit virustragendem Honigtau kontaminiert waren. Die Weiße Fliegen wurden nun zur Eiablage sieben Tage auf den Baumwollpflanzen gehalten. Anschließend wurden alle adulten Individuen entfernt, ihre DNA in Gruppen zu je 50 Individuen extrahiert (3 Parallelen) und der Virusgehalt bestimmt (s. Punkt 2.6.2 und 2.13.6). Die Baumwollpflanzen mit den Eiern wurden drei bis vier Wochen im Gewächshaus inkubiert (s. Punkt 2.1), bis die adulten Nachkommen in Erscheinung traten. Jeweils 50 Individuen der Nachkommen wurden abgesaugt, vereinigt, ihre DNA extrahiert und in einer qPCR der Virusgehalt bestimmt. Die restlichen Nachkommen (jeweils ca. 200) wurden für fünf Tage auf vier junge Wirtspflanzen transferiert. Anschließend wurden alle adulten Weiße Fliegen von den Pflanzen entfernt, je 50 Individuen vereinigt, ihre DNA extrahiert und der Virusgehalt quantifiziert. Die Wirtspflanzen wurden für 4 Wochen auf Symptomausprägung bonitiert. Zur Verhinderung einer Kontamination durch schlüpfende Nachkommen, wurden die Pflanzen mit dem Insektenwachstumsregulator Applaud (Nichino Europe, Cambridge, Großbritannien), wie vom Hersteller empfohlen, behandelt. Anschließend wurde mittels *DNeasy* die Gesamt-DNA aus ihren Blättern extrahiert und mittels PCR auf Viren untersucht (s. Punkt 2.6.6 und 2.13.6).

## **2.20 Barrieren für ein nicht durch Weiße Fliegen übertragbares Virus**

Um ein besseres Verständnis für die Rolle von Mitteldarm, Hämolymphe und Speicheldrüsen als Barrieren für den Virustransport in Population 95 zu erhalten, wurde der Frage nachgegangen, welche Organe als finale Barrieren für generell nicht durch Weiße Fliegen übertragbare Viren von Bedeutung sind. Die Wahl fiel auf ein

Nanovirus, da das Genom der Nanoviren ebenfalls aus einzelsträngiger zirkulärer DNA besteht, deren Komponenten von einem Hüllprotein enkapsidiert sind (Wanitchakorn *et al.*, 1997; Grigoras *et al.*, 2009). Vertreter aus der Familie der *Nanoviridae* werden zudem von Aphiden persistent zirkulativ nicht-propagativ übertragen (Franz *et al.*, 1998). Von dem Nanovirus *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) aus Äthiopien weiß man, dass es nicht durch Weiße Fliegen übertragen wird (persönliche Mitteilung Dr. Vetten, JKI, Braunschweig). Das *Faba bean necrotic stunt virus* besteht aus acht zirkulären DNA-Einzelsträngen, die für acht Proteine kodieren. Wirtspflanzen sind Fababohnen (*Vicia faba*) und Erbsen (*Pisum sativum*).

Um zu ermitteln welche Barriere die Nanoviruspartikel in den Weiße Fliegen nicht zu überwinden vermögen, wurden ca. 400 Individuen der Population 63 auf drei, 27 Tage alte, symptomatische FBNSV infizierte Erbsenpflanzen überführt und für 5 Tage inkubiert (Klimakammer, hell/dunkel, 16 h/8 h, 26 °C/18 °C). Die Erbsen waren 20 Tage zuvor von Erbsenläusen (*Acyrtosiphon pisum*) infiziert worden (s. Anhang 6.8). Anschließend wurden die Weiße Fliegen auf Nicht-Wirtspflanzen (Baumwolle) überführt und von diesem Zeitpunkt, für 7 Tage, alle 24 Stunden eine Stichprobe entnommen. Zu jedem Zeitpunkt wurden jeweils drei Mitteldärme präpariert und 3-mal Hämolymphe von 5 weiblichen Individuen vereint (s. Punkt 2.4 und 2.5). Nach 11 Tagen wurde eine letzte Probe genommen (Endwert). Als Positivkontrolle bei der Untersuchung der Hämolymphe, diente ein Mitteldarm vom Tag Null, der FBNSV enthielt. Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt Null, sowie zwei Tage nach Transfer auf die Nicht-Wirtspflanzen, Mitteldärme unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop observiert.

### 2.20.1 Relativer FBNSV-Gehalt in Mitteldärmen und Hämolymphe

In einer relativen qPCR wurde der relative FBNSV-Gehalt in präparierten Mitteldärmen und Hämolymphe anhand der Genomkomponente DNA-R bestimmt (Primer: FBNY69\_sybrc und FBNY69\_sybrs; Tab. 2.5). Als Referenzen diente die 18S DNA aus *B. tabaci* (Primer: Bemisia-3F und Bemisia-65R; Tab. 2.5). Die Mitteldärme wurden in jeweils 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen, für 6 min bei 95 °C denaturiert und dann in die qPCR eingesetzt. Hämolymphe wurde mit dem Öl, in dem sie isoliert wurde, eingesetzt, nachdem sie ebenfalls 5 min bei 95 °C inkubiert worden war. Zur relativen Quantifizierung wurde der KAPA SYBR FAST QPCR Master Mix Universal (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) verwandt. Zu beachten ist, dass selbst eine qPCR ein Detektionsmaximum besitzt. In diesem Versuch wurde beispielsweise eine Detektion von geringen Molekülzahlen im Reaktionsansatz durch die Amplifikation von

Primerdimeren gestört. SYBR-Green interkaliert sowohl in das gewünschte Amplifikat, als auch in andere Nukleotidstränge. Durch das Signal der Primerdimere wurde somit ein Detektionsmaximum festgelegt, welches im FBNSV-Nachweis bei ca. 33,5 Zyklen lag. Trotz dieser Einschränkung, ist die qPCR mit SYBR-Green immer noch um ein Vielfaches sensibler, als eine herkömmliche PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese.

Einfacher Reaktionsansatz zum Nachweis von FBNSV:

12,5	µl	KAPA SYBR FAST QPCR Master Mix Universal (PEQLAB, Erlangen, Deutschland)
0,5	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]
0,5	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]
6,5	µl	ddH <sub>2</sub> O
<u>5</u>	<u>µl</u>	<u>DNA</u>
25	µl	

Einfacher Reaktionsansatz zum Nachweis von 18S DNA aus *B. tabaci*:

12,5	µl	KAPA SYBR FAST QPCR Master Mix Universal (PEQLAB, Erlangen, Deutschland)
1,4	µl	Primer <i>sense</i> [10 µmol/l]
1,4	µl	Primer <i>anti-sense</i> [10 µmol/l]
4,7	µl	ddH <sub>2</sub> O
<u>5,0</u>	<u>µl</u>	<u>DNA</u>
25	µl	

Programm der PCR-Maschine:

95 °C	5 min	
95 °C	20 s	} 40 Zyklen
60 °C	60 s	

### 2.20.2 Relative Quantifizierung von FBNSV in Pflanzen

Zur Kontrolle, ob die symptomatischen Erbsen, sowie Fababohnen, tatsächlich mit dem FBNSV infiziert waren, wurde das Nanovirus ebenfalls in Blättern der Pflanzen mittels qPCR nachgewiesen (s. Anhang 6.8). Da eine qPCR zum Nachweis zum Einsatz kam, konnte gleichzeitig der relative FBNSV-Gehalt in den Wirtspflanzen berechnet werden. Aus jeweils 100 mg Blattmaterial wurde mittels *DNeasy* die DNA extrahiert und

photometrisch die Konzentration gemessen (s. Punkt 2.6.6). Jeweils zwischen 30 und 50 ng der DNA wurden in die qPCR eingesetzt (Reaktionsansatz: s. Punkt 2.20.1).

#### Berechnung des relativen FBNSV-Gehalts

Mittels Verdünnungen ist es nur sehr schwer möglich, verschiedene DNA-Aufreinigungen, die in einer qPCR miteinander verglichen werden sollen, exakt auf eine einheitliche Konzentration einzustellen. Daher wurden DNA-Aufreinigungen nur grob auf einen Wert zwischen 30 und 50 ng eingestellt, zum einen, um eine Mindestmenge zu gewährleisten und zum anderen, um eine Überladung der Reaktionen zu verhindern. Um dennoch vergleichende Aussagen zu Virusmengen in einheitlichen DNA-Mengen treffen zu können, wurde folgende Berechnung durchgeführt. Da bei einer optimal verlaufenden PCR nach jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA stattfindet, ist der Anstieg der Amplifikatmenge exponentiell. Die Amplifizierung beruht auf der Exponentialfunktion

$$x = a2^y \quad \begin{array}{l} x = \text{gewünschte DNA-Menge in ng} \\ a = \text{eingesetzte DNA-Menge (Matrize) in ng} \\ y = \text{unbekannter Exponent} \end{array} \quad (1)$$

Eine Umkehroperation des Potenzierens ist das Logarithmieren, daher kann die oben genannte Gleichung (1) nach  $y$  aufgelöst werden. Man erhält Gleichung (2).

$$y = \log_2(x/a) \quad (2)$$

Setzt man nun die gewünschte DNA-Menge  $x$  und den gemessenen DNA-Konzentrationswert  $a$  in Gleichung (2) ein, erhält man den theoretischen Exponenten  $y$ , der Gleichung (1) auflöst. Wird dieser Wert  $y$  vom tatsächlich in der qPCR erhaltenen Cq-Wert subtrahiert, erhält man den theoretischen Cq-Wert ( $[Cq-y]$ ), der bei einem Einsatz von gewünschter DNA-Menge  $x$  auftritt. Aus den  $[Cq-y]$ -Werten mehrerer paralleler Versuche, lässt sich ein Mittelwert ( $Cq_m$ ) bilden, der alle zur gewünschten einheitlichen DNA-Menge  $x$  gehörenden  $[Cq-y]$ -Werte vereint.

In diesem Versuch wurde ein Genfragment des FBNSV in Blättern von Fababohnen und Erbsen amplifiziert. Aufgrund von mehreren Wiederholungen gab es einen  $Cq_m$ -Wert für Fababohnen und einen  $Cq_m$ -Wert für Erbsen. Beide  $Cq_m$ -Werte repräsentieren die Schwellenwertzyklen, in denen die Reaktionen aus Fababohne und Erbse jeweils die gleiche unbekannte Menge an Amplifikat hervorgebracht haben. Es wurden nun

jeweils die  $C_{q_m}$ -Werte als Exponenten in die Gleichung (1) eingesetzt, die Gleichungen dann gleichgesetzt und das Verhältnis ausgerechnet (oder direkt der  $C_{q_m}$ -Wert der Fababohnen vom  $C_{q_m}$ -Wert der Erbsen subtrahiert und die erhaltene Differenz  $\Delta C_{q_m}$  in die Formel  $2^{\Delta C_{q_m}}$  eingesetzt). Der erhaltene Wert repräsentiert den Faktor, um den sich die FBNSV-Mengen in Fababohne und Erbse voneinander unterscheiden.

## 2.21 Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in *B. tabaci*

Zur Lokalisierung der Begomoviren in Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung angewandt. Die Ergebnisse dieser Methode wurden mit einer immunologischen Detektion überprüft.

Wie auch für die Quantifizierungen durch die qPCR, wurden die Weiße Fliegen synchronisiert. Drei bis fünf Tage alte adulte Tiere wurden für fünf Tage auf virusinfizierte symptomatische Wirtspflanzen überführt (AAP). Anschließend wurde für zwei Tage das Darmlumen dekontaminiert (s. Punkt 2.3). Dann wurden aus weiblichen Individuen Mitteldärme und primäre Speicheldrüsen präpariert (s. Punkt 2.4).

### 2.21.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Zur Fixierung wurden 30  $\mu$ l modifiziertes *Carnoy's fixative* (Puchtler *et al.*, 1968) auf die leicht angetrockneten Organe pipettiert und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde das *Carnoy's fixative* vollständig verdunstet und die Organe 3-mal mit 50  $\mu$ l Hybridisierungspuffer (HB) gewaschen.

Zur Hybridisierung wurden jeweils 30  $\mu$ l der Sonden-Suspension auf die Organe pipettiert. Die Sonde TYLCV-Cy3, welche speziell zum Nachweis der DNA des Hüllproteins von TYLCV entwickelt wurde, konnte auch zum Nachweis der DNA des Hüllproteins von WmCSV verwandt werden. Dazu wurden 10 pmol/l der Sonde TYLCV-Cy3 in 1 ml HB suspendiert. Die Objekte wurden über Nacht, bei RT, in einer feuchten Kammer, im Dunkeln, inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Objekte 3- bis 4-mal im Dunkeln mit HB und einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Optional wurden die Organe für 20 min mit 30  $\mu$ l einer DAPI-Lösung (Stammlösung: 4',6-Diamidino-2-phenylindol in PBS [0,142 mmol/l]) gefärbt. DAPI lagert sich an Nukleinsäuren an und ermöglicht unter Anregung mit UV-Licht (358 nm) eine Lokalisierung von Zellkernen und anderen Nukleinsäure-haltigen Organellen, bei einer Detektion des Emissionsmaximums von 461 nm.

Danach wurden die Organe in ddH<sub>2</sub>O mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht. Verwendet wurde das Leica TCS SP2 mit *Acusto Optical Beam Splitter* des



JKI Brauschweig (ausgestattet mit einem Argon/Krypton-Laser [unter anderem zur Aussendung von Strahlung der Wellenlänge 488 nm zur Anregung von FITC], einem Neon/Helium-Laser [550 nm zur Anregung von Cy3], einem Diodenlaser [405 nm zur Anregung von DAPI] und einer Durchlicht-Bilddetektion). Mitteldärme und primäre Speicheldrüsen wurden unter Verwendung von Immersionsöl an geeigneten Objektiven mit 20-facher und 63-facher Vergrößerung untersucht. Durch Verwendung der Rasterfunktion des konfokalen Mikroskops, konnten verschiedene Schichten des Mitteldarms gescannt werden (nicht gezeigt). Durch Analyse der hergestellten Bildstapel konnte sichergestellt werden, dass die erhaltenen Fluoreszenzsignale im Inneren der Zellen lokalisiert waren. Fluoreszenzaufnahmen sind das Resultat von Maximum-Projektionen, die aus 3 bis 15 Einzelschichtscans zu je 0,5 µm Stärke zusammengefügt wurden. Zur Unterscheidung von Autofluoreszenz und Emission der Farbstoffe wurden gestaffelte Wellenlängenscans ( $\lambda$ -Scan) im Spektrum von 560 nm bis 660 nm Wellenlänge des Lichts durchgeführt. Organbilder im differenziellen Interferenzkontrast wurden wie unter Punkt 2.4 beschrieben angefertigt.

#### Anmerkung

Optional wurden die Organe, zum besseren Auffinden unter dem Mikroskop, mit einer gefilterten *Coomassie Brilliant Blue G250*-Lösung (Stammlösung in ddH<sub>2</sub>O [0,605 mmol/l], Fluka/Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) für 1 min angefärbt. *Coomassie Brilliant Blue G250* besitzt keine Eigenfluoreszenz.

#### Carnoy's fixative (modifiziert)

Chloroform / Ethanol / Ethansäure (Eisessig), [6/3/1, (v/v/v)]

#### Hybridisierungspuffer (HB, 1 Liter)

2,42 g	TRIS
52,59 g	Natriumchlorid
0,01 % (w/v)	SDS
30 % (v/v)	Formamid

TRIS-Lösung mit Salzsäure auf pH 8 eingestellt, dann Zugabe der weiteren Chemikalien.

Sonde

Name:	TYLCV-Cy3
Sequenz:	5'-GGAACATCAGGGCTTCGATA-3'
Modifikation:	Cy3
	Optimale Anregung: 538 nm
	Emissionsmaximum: 570 nm
Ziel-DNA:	Gen des Hüllproteins (V1/CP)
Referenz:	Ghanim <i>et al.</i> (2009)
Suspension:	10 pmol der Sonde in 1 ml HB suspendiert

**2.21.2 Lokalisierung von WmCSV und F-Aktin in Mitteldärmen**

Um einen besseren Überblick über die Verteilung der aufgenommenen Viren im Mitteldarm zu bekommen, wurde das Strukturprotein F-Aktin mit fluoreszenzmarkiertem Phalloidin gefärbt. Die in Mitteldarmzellen enthaltenen WmCSV-Genome wurden mit FISH-Sonden lokalisiert.

Dazu wurden Mitteldärme aus entladenen weiblichen Individuen der *B. tabaci* Population 63 präpariert (s. Punkt 2.4) und für 15 Minuten mit CBS, der 4 % Formaldehyd enthielt, fixiert. Anschließend wurden die Mitteldärme 3-mal für 5 Minuten mit einfachem PBS gespült. Es folgte eine Permeabilisierung für 10 Minuten in TBS, welcher mit 0,5 % Triton-X-100 versetzt war. Anschließend wurden die Mitteldärme 3-mal mit TBS, dem 0,1 % Triton X-100 zugefügt war, gespült. Es folgte die Hybridisierung mit 30 µl der Cy3-markierten DNA-Sonde (s. Punkt 2.21.1), über Nacht, bei 4 °C, im Dunkeln.

Am nächsten Tag wurde die Sonde entfernt, die Mitteldärme mit TBS, dem 0,1 % Triton X-100 zugegeben wurde, gespült und eine Phalloidin-Färbung durchgeführt. Dazu wurden 30 µl einer Phalloidin-Lösung auf die Objekte pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur, im Dunkeln inkubiert. Es schlossen sich drei Waschschrte, mit TBS, dem 0,1 % Triton X-100 zugefügt war, an. Am konfokalen Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate untersucht (s. Punkt 2.21.1). Das Phalloidin wurde, wie vom Hersteller empfohlen, mit 488 nm Wellenlänge des Lichts des Argon-Ionen Lasers angeregt.

Cytoskeleton buffer with sucrose (CBS, 1 Liter)

1,95 g	MES
10,23 g	Kaliumchlorid
295,63 mg	Magnesiumchlorid
760,70 mg	EGTA

Lagerung bei 4 °C.

Zugabe von Saccharose erfolgte frisch auf eine Endkonzentration von 0,32 mol/l.

Phosphate buffered saline (PBS, 1 Liter)

8,18 g	Natriumchlorid
176,27 mg	Kaliumdihydrogenphosphat
1,15 g	Dinatriumhydrogenphosphat (wasserfrei)
0,2 g	Kaliumchlorid
0,2 g	Natriumazid

Mit Natriumhydroxid pH 7,4 eingestellt. Autoklaviert bei 121 °C.

Lagerung bei Raumtemperatur.

Tris-buffered saline (TBS, 1 Liter)

8,77 g	Natriumchlorid
2,42 g	TRIS

Mit Salzsäure pH 7,4 eingestellt. Autoklaviert bei 121 °C.

Lagerung bei Raumtemperatur.

Phalloidin-Lösung

Name:	Atto 488 Phalloidin (40409)
Referenz:	Sigma Life Science, Buchs, Schweiz
Stock-Konz.:	10 nmol in 100 µl ddH <sub>2</sub> O
Verdünnung:	1:200 in PBS (Endkonzentration: 100 µmol/l)
Optimale Anregung:	501 nm
Emissionsmaximum:	523 nm

## **2.22 Selektion einer nicht übertragenden *B. tabaci* Population aus der schwach übertragenden Population 95**

Mittels klassischer Selektion wurde aus der schwach Begomovirus übertragenden *B. tabaci* Population 95 (10 - 20 %) eine Subpopulation gezüchtet, die WmCSV und TYLCV nicht überträgt (0 %, Population 95-).

Dazu wurden Eier tragende Weibchen der *B. tabaci* Population 95 auf junge Auberginen- und Baumwollpflanzen vereinzelt (14 Parallelen). Nach 3 – 4 Wochen schlüpften die Nachkommen (2. Generation, jeweils ca. 20 bis 60 Individuen) der jeweiligen Mutterorganismen. Diese Nachkommen wurden jeweils in zwei Gruppen getrennt. 50 % der Individuen dienten als virusfreie Zuchttiere, um die Linie des Mutterorganismus zu erhalten. Die restlichen Insekten wurden auf ihre TYLCV Übertragungsrate untersucht (s. Punkt 2.22.1).

Wurde eine verringerte Übertragungsrate festgestellt, so wurden aus dieser Linie wiederum Weibchen vereinzelt (5 Parallelen, A – E) und eine 3. Generation gezüchtet. Die beschriebenen Schritte wurden so oft durchgeführt, bis eine Subpopulation heraus selektiert war, die TYLCV nicht mehr übertragen konnte.

War die Individuenzahl für eine stabile Subpopulation entsprechend groß genug, wurde die Übertragungsrate einer Gruppe von Individuen bestimmt (s. Punkt 2.22.2).

Als eine nicht TYLCV übertragende Subpopulation selektiert war, wurde sie auf die Übertragungsfähigkeit von WmCSV untersucht (s. Punkt 2.22.3).

### **2.22.1 TYLCV Übertragungsrate einzelner Individuen**

50 % der Nachkommen von einzelnen Individuen (s. Punkt 2.22), wurden für 5 Tage auf TYLCV infizierte symptomatische Tomaten transferiert. Einzelne Individuen dieser 2. Generation wurden anschließend isoliert und separat auf gesunde virusfreie junge Tomaten überführt (3-Blatt-Stadium, Abb. 2.4). Dazu wurden die Weiße Fliegen kurz auf 4 °C gekühlt und bei eintretender Bewegungsunfähigkeit mittels eines feinen Pinsels auf die Wirtspflanzen übergesetzt. Nach 7 Tagen wurden die Weiße Fliegen von den Pflanzen entfernt und mittels qPCR das Vorhandensein der Viren überprüft (s. Punkt 2.6.4 und Punkt 2.13.3). Die Pflanzen wurden für 4 Wochen beobachtet, auf Symptomausprägung bonitiert und dann mittels PCR auf Virusinfektion überprüft (s. Punkt 2.6.6 und 2.12). Anschließend wurde die Infektionsrate bestimmt.



**Abbildung 2.4: Versuchsaufbau zur Überprüfung der Infektion von Wirtspflanzen durch einzelne Individuen von *B. tabaci* Population 95.** Jeweils eine virustragende Weiße Fliege wurde auf eine Wirtspflanze transferiert. Jede Pflanze wurde mittels einer Plexiglasröhre von den anderen Pflanzen isoliert. Die Röhren wurden im klimatisierten Gewächshaus unter konstanten Bedingungen inkubiert (24-26 °C/18 °C, 16 h/8 h, hell/dunkel). Nach 7 Tagen wurden die Weiße Fliegen, sowie die Röhren entfernt. Die Pflanzen wurden für 4 Wochen auf Symptomausprägung bonitiert.

### 2.22.2 TYLCV Übertragung durch Gruppen von Individuen

Die anderen 50 % der Nachkommen wurden in einem Käfig isoliert gehalten, bis weitere Generationen geschlüpft waren. Anschließend wurden ca. 300 Individuen dieser Linie für 3 Tage auf TYLCV infizierte symptomatische Tomaten transferiert und dann gemeinsam auf 15 virusfreie gesunde junge Tomaten überführt. Somit war eine große Anzahl von Individuen vorhanden, die bei Übertragungskompetenz eine entsprechend große Virusmenge in die Wirtspflanzen injizieren konnten.

Mehrmals täglich wurden die Weiße Fliegen aufgeschüttelt, um eine randomisierte Verteilung zu gewährleisten. Nach 7 Tagen wurden die Weiße Fliegen von den Pflanzen entfernt und für eine DNA-Extraktion, zu drei Parallelen je ca. 100 Individuen, aliquotiert (s. Punkt 2.6.2). Mittels PCR wurde das Vorhandensein der Viren überprüft (s. Punkt 2.12). Die Pflanzen wurden 4 Wochen auf Symptomausprägung bonitiert und dann mittels PCR auf Virusinfektion überprüft (s. Punkt 2.6.6 und 2.12).

### **2.22.3 Übertragungskompetenz einzelner Individuen sowie von Gruppen in Hinblick auf WmCSV**

Nachdem eine TYLCV nicht übertragende *B. tabaci* Population selektiert war, wurde sie auf ihre Übertragungsrate von WmCSV untersucht.

Einige hundert Individuen der herangezogenen Population wurden für 5 Tage auf WmCSV infizierte Wassermelonen transferiert. Anschließend wurden einzelne Individuen isoliert auf einzelne gesunde virusfreie junge Wassermelonen (25 Parallelen) überführt.

Parallel wurden die WmCSV tragenden Insekten in Gruppen von 20 bis 300 Individuen auf 20 junge virusfreie Wassermelonen überführt. Auch hier wurden die Weiße Fliegen täglich aufgeschüttelt, um eine randomisierte Verteilung zu gewährleisten.

Nach 7 Tagen wurden die Weiße Fliegen von den Pflanzen entfernt und mittels PCR das Vorhandensein von WmCSV A und B überprüft (s. Punkt 2.6.2, 2.6.4 und 2.11). Pflanzen, auf denen einzelne Individuen gesetzt worden waren, diese aber nach sieben Tagen nicht mehr lebend anzutreffen waren, wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die übrigen Pflanzen wurden für mindestens 4 Wochen beobachtet, auf Symptomausprägung bonitiert und dann mittels PCR auf Virusinfektion überprüft. Anschließend wurde die Infektionsrate bestimmt.

### **2.22.4 Verifizierung der Übertragungsrate von Population 63 und 95**

Zum Vergleich, sowie als Kontrolle der Ermittlung der Übertragungsraten der neuen nicht übertragenden Population 95-, wurden auch die Übertragungsraten von Populationen 63 und 95 überprüft. Nach Inkubation mit TYLCV tragenden einzelnen Individuen je Pflanze (3 Parallelen zu je 25 Individuen, AAP = 5 Tage, *inoculation access period* [IAP] = 7 Tage) und Beobachtung der Tomaten (4 Wochen), wurde eine Infektionsrate für Tomaten von 96,6 % ermittelt. Bei der Übertragung von TYLCV durch eine Gruppe von 20 bzw. ca. 300 Individuen, wurden stets alle Wirtspflanzen infiziert und symptomatisch. Nach Übertragung von TYLCV durch einzelne Individuen der Population 95 waren 15 % der Tomaten infiziert.

Nach Übertragung von WmCSV durch einzelne Individuen der Population 63, die sieben Tage auf den Wassermelonen gesaugt hatten, waren 32,4 % (22 von 68) der Pflanzen infiziert. Nach Übertragung durch Gruppen von 20 oder mehr Individuen, wurden innerhalb der vierwöchigen Bonitur alle Wassermelonen symptomatisch. Vermutet wird, dass die Virusmenge, die durch einzelne Individuen übertragen wird, nicht ausreicht, um eine Wassermelonenpflanze erkranken zu lassen. Erst der

Virusdruck, der durch mehrere Weiße Fliegen erzeugt wird, führt dazu, dass die Pflanzen erkranken. So wurden 43,3 % der Wassermelonen symptomatisch, die mit Gruppen von virustragenden Individuen der Population 95 inkubiert wurden (300 Weiße Fliegen auf 15 Pflanzen).

## **2.23 Protein-Virus-Interaktionen**

### **2.23.1 Immunolokalisierung von Hsp70 und Ko-Immunolokalisierung von Hsp70 mit WmCSV bzw. TYLCV**

Für eine Lokalisierung von WmCSV, TYLCV und Hsp70 mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern, wurden Weiße Fliegen fünf Tage auf virusinfizierten symptomatischen Wirtspflanzen inkubiert. Anschließend wurden die Insekten auf Nicht-Wirtspflanzen (Baumwolle) transferiert, um das Lumen des Verdauungstraktes zu dekontaminieren. Am Binokular wurden Mitteldärme präpariert (s. Punkt 2.4) und mit Paraformaldehyd (4 % in PBS) für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Mitteldärme 3-mal für 5 Minuten mit einfachem PBS gespült. Es folgte eine Permeabilisierung für 10 Minuten in TBS, welcher mit 0,5 % Triton-X-100 versetzt war. Daran schlossen sich drei Spülvorgänge mit PBS zu je 5 Minuten an, sowie eine Blockierung mit jeweils 30 µl 5%iger Magermilch, bei 22 °C, für ca. eine Stunde, in einer feuchten Kammer, um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern. Anschließend wurde wiederum 3-mal wie zuvor gespült. Es folgte die gleichzeitige Anlagerung der ersten Antikörper gegen virale Hüllproteine und Hsp70 (je 30 µl, Tab. 2.6), für eine Stunde bei 20 °C. Nach drei weiteren Spülvorgängen erfolgte die gleichzeitige Anlagerung der zweiten Antikörper (je 30 µl, Tab. 2.6), bei 4 °C, über Nacht, im Dunkeln, in einer feuchten Kammer. Am nächsten Morgen wurden die Mitteldärme 3-mal wie zuvor gespült. Optional wurde für ca. 10 Minuten eine Nukleinsäurefärbung mit jeweils 30 µl einer DAPI-Lösung (Stammlösung: 4',6-Diamidino-2-phenylindol in PBS [0,142 mmol/l]) durchgeführt. Es folgten zwei weitere Spülschritte in PBS und ein Spülschritt in ddH<sub>2</sub>O. Nach Auflage eines Deckgläschens, wurden die Mitteldärme am konfokalen Fluoreszenzmikroskop untersucht (s. Punkt 2.21.1).

**Tabelle 2.6: Primäre und sekundäre Antikörper zum immunologischen Nachweis von WmCSV- und TYLCV-Hüllproteinen, sowie *B. tabaci* Hsp70.** OA Optimale Wellenlänge zur Anregung, EM Emissionsmaximum des Fluorophors, \* Antikörper zu Punkt 2.23.3

Detektion von	Name des 1. bzw. 2. Antikörpers	Modifikation	Verdünnung	Referenz
WmCSV	Kaninchen Anti-WmCSV 830		1:100 in HB Endkonzentration: 19,5 µg/ml	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
	Ziege Anti-Kaninchen IgG	FITC OA: 485 nm EM: 519 nm	1:100 in HB Endkonzentration: 15 µg/ml	Code Nr. 111-095-003, Dianova, Hamburg, Deutschland
TYLCV	Kaninchen Anti-Gemini-CP		1:100 in PBS Endkonzentration: 19,5 µg/ml	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
	Ziege Anti-Kaninchen IgG	FITC OA: 485 nm EM: 519 nm	1:100 in HB Endkonzentration: 15 µg/ml	Code Nr. 111-095-003, Dianova, Hamburg, Deutschland
Hsp70	Maus, HSP70 5A5 (monoklonal)		1:100 in PBS Endkonzentration: 2 µg/ml	ab74072, abcam, Cambridge, Großbritannien
	Ziege Anti-Maus IgG	Cy3 OA: 550 nm EM: 570 nm	1:100 in PBS Endkonzentration: 15 µg/ml	Code Nr. 115-165-003, Dianova, Hamburg, Deutschland
Hsp70 *	Kaninchen polyklonal gegen Hsp70		1:10 in Nährlösung Endkonzentration: 0,02 mg/ml	ab31010, abcam, Cambridge, Großbritannien
	Ziege Anti-Kaninchen IgG	FITC OA: 485 nm EM: 519 nm	1:100 in HB Endkonzentration: 15 µg/ml	Code Nr. 111-095-003, Dianova, Hamburg, Deutschland

### 2.23.2 Quantifizierung von *hsp70* mRNA in virusfreien und virustragenden *B. tabaci* der Population 63 und 95

Da die Interaktion zwischen Begomoviren und Hsp70 Auswirkungen auf den Expressionslevel des *hsp70* Gens haben kann, wurde dieser ermittelt. Dazu wurden vier Tage alte synchronisierte Weiße Fliegen der Population 63 und 95 jeweils zum einen auf virusfreie Wirtspflanzen überführt und zum anderen auf virusinfizierte Wirtspflanzen. Nach zwei und nach neun Tagen wurden jeweils 100 Individuen gesammelt und die Gesamt-RNA extrahiert (s. Punkt 2.6.5). Als Wirtspflanzen dienten virusfreie und WmCSV infizierte Wassermelonen, virusfreie und TYLCV infizierte Tomaten, virusfreie und FBNSV infizierte Fababohnen und Erbsen.

Durch die Reverse Transkriptase des *Moloney murine leukemia virus* (M-MLV RT), wurden jeweils 2 µl der mRNA des *hsp70* und des Haushaltsgens für  $\beta$ -Aktin in



komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Um Pipettierfehler gering zu halten wurde zuvor die Gesamt-RNA 1:5 verdünnt. Anschließend erfolgte ohne Unterbrechung (*one step*) die Amplifikation der cDNA in einer quantitativen PCR. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Die Amplifikation beider Gene wurde parallel in einer Platte durchgeführt. Verwendete Materialien, Geräte und Programme zur Auswertung entsprachen denen zum Nachweis von WmCSV und TYLCV (s. Punkt 2.13).

Das Verhältnis zwischen der mRNA des immer gleich exprimierten Haushaltsgens (Referenzgen) und der mRNA von *hsp70* wurde nach der Formel  $\Delta Cq = Cq_{\beta\text{-Aktin}} - Cq_{hsp70}$  berechnet.  $\Delta Cq$  gibt den relativen Expressionslevel von *hsp70* an, unter der Annahme, dass alle durchgeführten Reaktionen mit einer Effizienz von 2,0 stattfanden.

Eine Berechnung der Expressionsrate ( $R$ ) nach der Formel

$$R = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta Cq_{\text{Zielgen}}(\text{Kontrolle-Probe})} / (E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta Cq_{\text{Referenzgen}}(\text{Kontrolle-Probe})} \quad (\text{Pfaffl, 2001})$$

wurde nicht angestrebt, da nur ein Gen betrachtet wurde, die exakte Effizienz ( $E$ ) der einzelnen Reaktionen für die zu treffende Aussagen von nicht entscheidender Relevanz war und keine *hsp70* Kontrolle zur Verfügung stand. Um aber dennoch eine unverfälschte Aussage zur Expression von *hsp70* treffen zu können, wurden alle Einzelexperimente auf die erhaltenen Werte für  $\beta$ -Aktin der virusfreien Individuen normiert. Dadurch war auch ein gemeinsames Darstellen von biologischen Wiederholungen möglich.

Eine Wiederholung (Ansatz) bestand immer aus zwei Gruppen synchronisierter Weiße Fliegen einer Population. Zum einen jene, die an virusfreien Wirtspflanzen gesaugt hatten (Gruppe 1) und zum anderen aus Weiße Fliegen der gleichen Generation, die an infizierten Pflanzen gesaugt hatten (Gruppe 2). Jeder dieser Ansätze bestand aus drei Parallelen. Für jede Parallelle wurde nach der RT qPCR ein  $\Delta Cq$ -Wert berechnet. Aus den  $\Delta Cq$ -Werten der Parallelen wurde für jeden Ansatz ein Mittelwert gebildet (Ansatzmittelwert).

Aus den Ansatzmittelwerten von vier Wiederholungen der Gruppe 1, wurde ein Gesamtmittelwert berechnet. Dann wurde zwischen dem Ansatzmittelwerten und dem Gesamtmittelwert die Differenz gebildet. Diese Differenz wurde vom zugehörigen Ansatzmittelwert der Gruppe 2 abgezogen. Somit waren die  $\Delta Cq$ -Werte aus verschiedenen Ansätzen normiert worden und eine gemeinsame graphische Darstellung aller Ansätze in einem Diagramm (Boxplot) wurde möglich, sowie ein Vergleich mit anderen Populationen. Auch die unterschiedlichen RNA-Mengen, die anfangs eingesetzt wurden, waren somit bis auf die Ebene der Ansatzmittelwerte ausgeglichen (s. Anhang 6.7).

Um die Faktoren zu bestimmen, in denen sich *hsp70* Expressionslevel zwischen Insekten, die virusfrei waren und Insekten die mit Virus in Kontakt kamen, wurde jeweils die Differenz zwischen Gesamtmittelwert der virusfreien Weiße Fliegen und dem Gesamtmittelwert der normierten Ansatzmittelwerte der virustragenden Weiße Fliegen gebildet. Diese Differenz (*delta delta Cq*,  $\Delta\Delta Cq$ ) wurde in die Gleichung „n-fache Expression (virusfrei zu virustragend) =  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ “ (Pfaffl, 2001), eingesetzt, um den jeweiligen Faktor zu erhalten.

Einfacher Reaktionsansatz der relativen *one step* RT qPCR:

12,5	μl	KAPA SYBR FAST QPCR Master Mix Universal (PEQLAB, Erlangen, Deutschland)	
0,5	μl	Primer <i>sense</i> [10 μmol/l]	} Invitrogen, Life Technologies Carlsbad, Kalifornien, USA
0,5	μl	Primer <i>anti-sense</i> [10 μmol/l]	
0,15	μl	M-MLV RT	
1,35	μl	ddH <sub>2</sub> O	
10	μl	<u>Gesamt-RNA (1:5 verdünnt)</u>	
25	μl		

Programm der PCR-Maschine:

43 °C	40 min		cDNA-Synthese
95 °C	3 min		Inaktivierung und Denaturierung
95 °C	15 s	} 40 Zyklen	Denaturierung
59 °C	20 s		<i>Annealing</i>
72 °C	30 s		DNA-Synthese

### 2.23.3 Fütterung von anti-Hsp70 Antikörper

In einem Fütterungsversuch wurden Antikörper gegen Hsp70 an die Weiße Fliegen gefüttert. Es wurde angenommen, dass die Antikörper das Weiße Fliege-eigene Hsp70 Protein blockieren. Anschließend wurde die Transmissionsrate der Weiße Fliegen überprüft. Nach Auswertung der Wirtspflanzenbonitur, war es möglich eine Aussage über die Funktion des Hsp70 bei der Virusübertragung zu treffen.

Der Versuchsaufbau gestaltete sich ähnlich zu dem in Abbildung 2.3 dargestellten. Die Nährlösung war mit einem anti-Hsp70 Antikörper versetzt worden (Tab. 2.6). Als Kontrolle wurde die Nährlösung mit Präimmunserum versetzt. Der Versuch wurde je Population in zwei Wiederholungen durchgeführt. Je Wiederholung wurden 3-mal 50,

sieben Tage alte, Insekten in ein Falcon-Röhrchen überführt. Der Ansatz wurde bei 24 °C für 24 Stunden im Gewächshaus inkubiert (AAP1).

#### Lokalisierung von anti-Hsp70

Nachdem sich die Weiße Fliegen von der mit anti-Hsp70 Antikörpern versetzten Nährlösung ernährt hatten, wurden aus Weibchen die Mitteldärme heraus präpariert (s. Punkt 2.4) und mit sekundären Antikörpern hybridisiert (Tab. 2.6). Am konfokalen Fluoreszenzmikroskop (s. Punkt 2.21.1) wurden die sekundären Antikörper detektiert. Dieses Experiment diente der Kontrolle, dass die primären Antikörper tatsächlich in die Zellen des Mitteldarms der Weiße Fliegen aufgenommen wurden. Der Nachweis der Fluoreszenzsignale der Antikörper wurde durch  $\lambda$ -Scans im Bereich von 500 bis 670 nm verifiziert.

#### Infektion von Wirtspflanzen und Bonitur

In einem parallelen Ansatz wurde, nachdem sich die Individuen von der mit anti-Hsp70 Antikörpern versetzten Nährlösung ernährt hatten, diese durch eine zweite Nährlösung ersetzt, welche anstelle der Antikörper eine TYLCV-Aufreinigung enthielt. Dabei war bedeutend, dass die Virusmengen, die den Weiße Fliegen nun angeboten wurden, für Präimmunserumkontrolle und anti-Hsp70 Fütterung, absolut gleich waren. Von der zweiten Nährlösung ernährten sich die Insekten weitere 24 Stunden (AAP2). Anschließend wurde jeweils zwei Weiße Fliegen für sieben Tage (IAP) auf je eine junge Tomate transferiert (vergleiche Abb. 2.4). Nach diesen sieben Tagen, wurde zur Kontrolle jede Weiße Fliege, die zu diesem Zeitpunkt noch vital war, einer Virusquantifizierung unterzogen (s. Punkt 2.6.4 und 2.13). Jene Wirtspflanzen, von denen sich nach sieben Tagen vitale Insekten sammeln ließen, wurden für 29 Tage auf TYLCV Infektion bonitiert. Pflanzen, bei denen nach diesem Zeitraum keine Infektion augenscheinlich ersichtlich war, wurden mittels PCR auf TYLCV untersucht (s. Punkt 2.6.6 und 2.12).

#### Nährlösung (nach Elwazzan)

15 % Saccharose (w/v) in Phosphatpuffer [0,1 mol/l]

Steril filtriert.

#### Präimmunserum

Kaninchen Präimmunserum, Verdünnung: 1:10 in Nährlösung

TYLCV Aufreinigung

Konz. Stock: 8 µg/µl in Phosphatpuffer [0,5 mol/l] + EDTA [2,5 mmol/l],  
pH 7,0

Verdünnung: 1:16,5 in Nährlösung (Endkonzentration: 0,46 µg/µl)

Phosphatpuffer (1 Liter, [0,5 mol/l])

59,99 g Natriumdihydrogenphosphat

70,98 g Di-Natriumhydrogenphosphat (wasserfrei)

Mit Natriumhydroxid auf pH 7,2 eingestellt.

Autoklaviert bei 121 °C. Lagerung bei Raumtemperatur.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Die sekundären Endosymbionten von *B. tabaci* Population 63 und 95

Um auszuschließen, dass die unterschiedlichen Begomovirus-Transmissionsraten der MEAM1 Populationen 63 und 95 in einem unterschiedlichem Vorhandensein der sekundären prokaryotischen Endosymbionten begründet sind, wurden die Weiße Fliegen mittels PCR geschlechtsspezifisch auf die Anwesenheit der sechs, in der phylogenetischen *Africa-Middle East-Asia Minor*-Gruppe bekannten, fakultativ möglichen, sekundären Endosymbionten untersucht.

Weder *Arsenophonus*, noch *Cardinium* oder *Fritschea* ließen sich in den *B. tabaci* Populationen 63 und 95 nachweisen. Demgegenüber wurden die sekundären Endosymbionten *Hamiltonella*, *Rickettsia* und *Wolbachia* in beiden untersuchten Populationen nachgewiesen (Tab. 3.1) wobei *Hamiltonella* und *Rickettsia* gleich häufig auftraten.

Da in beiden Vektorpopulationen eine ähnliche Besiedelung mit Endosymbionten festgestellt werden konnte, sind die unterschiedlichen Virusübertragungsraten nicht durch die vorhandenen oder fehlenden Endosymbionten zu erklären.

**Tabelle 3.1: Sekundäre Endosymbionten von *B. tabaci* Population 63 und 95, sowie die Häufigkeit ihrer Detektion in getrennt untersuchten Männchen (♂) und Weibchen(♀) in Prozent (n =20, N = 120).**

Sekundäre Endosymbionten von <i>B. tabaci</i>			Vorkommen in Individuen der Population in %			
Genus	Ordnung	Klasse	63		95	
			♀	♂	♀	♂
<i>Arsenophonus</i> sp.	<i>Enterobacteriales</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	0	0	0	0
<i>Hamiltonella</i> sp.	<i>Enterobacteriales</i>	<i>γ-Proteobacteria</i>	80	100	100	100
<i>Cardinium</i> sp.	<i>Bacteroidales</i>	<i>Bacteroidetes</i>	0	0	0	0
<i>Fritschea</i> sp.	<i>Chlamydiales</i>	<i>Chlamydiae</i>	0	0	0	0
<i>Rickettsia</i> sp	<i>Rickettsiales</i>	<i>α-Proteobacteria</i>	90	57	90	43
<i>Wolbachia</i> sp.	<i>Rickettsiales</i>	<i>α-Proteobacteria</i>	95	65	100	100

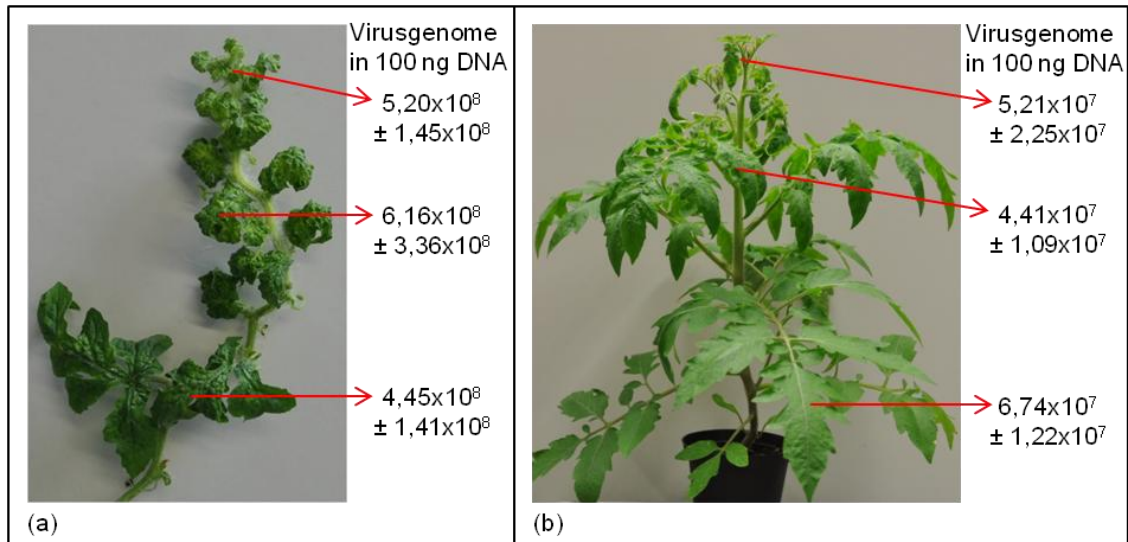
### 3.2 Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in virusinfizierten Pflanzen und *B. tabaci*

Da die Besiedelung beider Populationen mit sekundären Endosymbionten nur geringfügige Unterschiede aufwies, wurde die Fragestellung verfolgt, ob sich die Populationen in der Virusaufnahme und –translokation unterscheiden. Zur Quantifizierung der Viren wurde eine qPCR durchgeführt und in absoluten und relativen Verfahren verrechnet. Standardkurven wurden erstellt und die Messgenauigkeit überprüft und auch sichergestellt, dass die Quantifizierung von nur einer Genomkomponente des WmCSV die Viruskonzentration des bipartiten Virus genau erfasst (s. Anhang 6.3). Um Quantifizierungsdaten aus DNA gesamter Individuen mit Daten aus präparierten Organen sinnvoll vergleichen zu können, wurde ein Näherungswert festgelegt, der einem durchschnittlichen *B. tabaci* Individuum ca. 100 ng DNA zumisst (s. Anhang 6.4).

#### 3.2.1 Absolute Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in infizierten symptomatischen Wirtspflanzen

Für Quantifizierungen von WmCSV und TYLCV aus *B. tabaci* war es erforderlich, dass die Insekten definierte Mengen an Viren aufnehmen. Da die Experimente unter möglichst natürlichen Bedingungen durchgeführt werden sollten, wurden die Insekten auf virusinfizierten Wirtspflanzen zur Virusaufnahme gehalten. Um auszuschließen, dass unterschiedliche Virustiter in verschiedenen Blattetagen zu einer unterschiedlichen Beladung der Insekten führten, wurde zunächst der Virusgehalt in den Wirtspflanzen quantifiziert. Abbildung 3.1 zeigt eine junge WmCSV infizierte symptomatische Wassermelone und eine junge TYLCV infizierte Tomate, sowie den durchschnittlichen Virusgehalt in drei Blattetagen. Zunächst wurde festgestellt, dass die Konzentration von WmCSV in infizierten Wassermelonen um mehr als das 9-fache höher war, als TYLCV in infizierten Tomaten. Die Zahl der errechneten Virusgenome unterschied sich jedoch in den Blattetagen nur unwesentlich womit der Einfluss der Blattetage auf die Virusaufnahme ausgeschlossen werden konnte.

Quantifizierungsexperimente wurden parallel mit Weiße Fliegen und mit virusinfizierten Pflanzen durchgeführt, um unterschiedliche Virusgehalte der *B. tabaci* Populationen eindeutig der Weiße Fliege zuordnen zu können. Da auch die Standardabweichungen der Virusgehalte verschiedener Pflanzen relativ gering waren, werden die Virusgehalte der Pflanzen bei der Darstellung der Ergebnisse nicht explizit erwähnt.



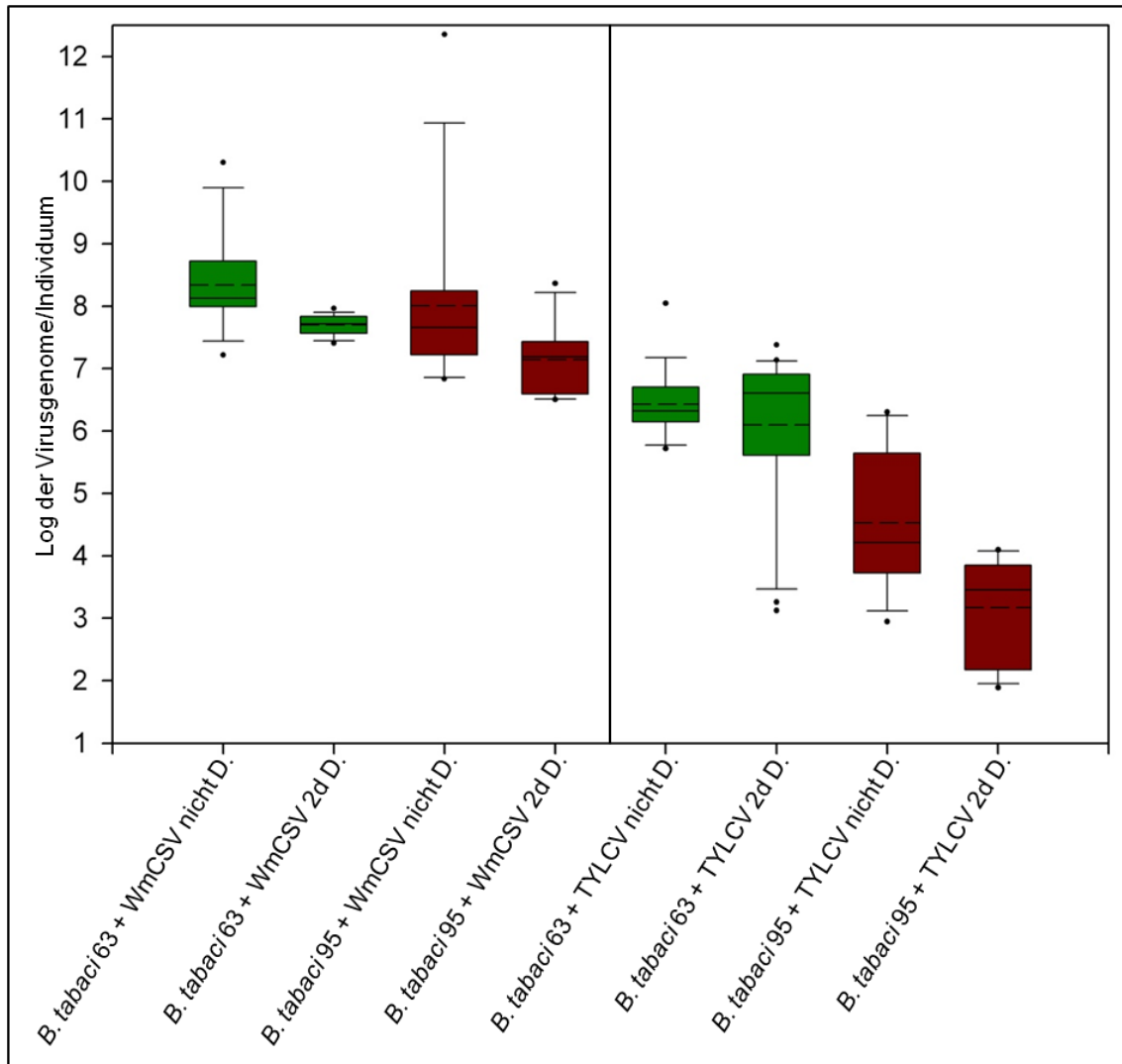
**Abbildung 3.1: WmCSV und TYLCV infizierte Wirtspflanzen mit Anzahl der Virusgenome je 100 ng DNA aus drei Blattetagen.** (a) Junge infizierte Wassermelone mit starker Blattkräuselung. WmCSV wurde mittels qPCR aus Blattetage 1 bis 3 (vereinigt), Blattetage 9 und 14 quantifiziert. (b) Infizierte Tomate mit gelber Blattaufhellung der jungen Blätter. Die älteren Blattetagen, 8 bis 12, waren symptomlos. TYLCV wurde in den Blattetagen 1 bis 3 (vereinigt), 7 und 10 quantifiziert.

### 3.2.2 Viruskonzentration in virustragenden *B. tabaci*

Mit dem Saugen von Pflanzensaft nehmen alle Insekten und auch Individuen der nicht oder nur sehr ineffizient übertragenden Population 95 Pflanzenviren auf, die vor allem im Verdauungstrakt verbleiben. Für die Bestimmung der Vektoreigenschaften sind jedoch nur die Viren von Bedeutung, die vom Darmlumen in die Gewebe der Insekten aufgenommen werden. Die lediglich im Darmlumen verbleibenden und dann ausgeschiedenen Viren verfälschen eine Quantifizierung besonders stark, weil oft sehr hohe Virusmengen aufgenommen werden. Um eine Quantifizierung dieser störenden Viren zu vermeiden, wurden die Weiße Fliegen nach Virusaufnahme von den symptomatischen Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen transferiert. Nach 2 Tagen war dann das Lumen der Verdauungstrakte soweit von Viren gereinigt, dass exakte Messungen durchgeführt werden konnten. Hier kann festgestellt werden, dass vollständige Virusfreiheit aufgrund der Komplexität des Verdauungstrakts, wahrscheinlich niemals zu erreichen ist. Durch den Vergleich von Weiße Fliegen, die dekontaminiert (entladen) wurden, mit Weiße Fliegen die nicht dekontaminiert wurden, wird jedoch die große Relevanz einer Entladung des Verdauungstraktlumens für die Quantifizierung von Viren deutlich.

Generell ist der Virusgehalt in entladenen Weiße Fliegen geringer, als in nicht entladenen Weiße Fliegen (Abb. 3.2; Mediane und Mittelwerte s. Tab. 6.2). Für WmCSV war der Virusgehalt in nicht entladenen Insekten um das 2,5 bis 3 fache höher

als bei entsprechenden Individuen, die nach 2 Tagen auf Nicht-Wirtspflanzen untersucht wurden. Individuen der Population 95 wiesen einen geringeren WmCSV-Gehalt als Individuen der Population 63 auf, der jedoch aufgrund der großen Standardabweichungen nicht signifikant war. Die sehr ineffiziente Population 95 wies, ebenso wie die gut übertragende Population 63, sehr hohe Viruszahlen in Geweben auf (vergleiche Punkt 3.2.5).



**Abbildung 3.2: Absoluter Virusgehalt in Individuen von *B. tabaci* der Population 63 und 95, nach einer Saugeperiode von 5 Tagen und anschließender Dekontaminierung des Verdauungstraktes.** Untersucht wurden Gruppen von 100 Individuen mit je 5 Paralleluntersuchungen in 3 biologischen Wiederholungen. D. dekontaminiert.

Der TYLCV-Gehalt von entladenen und nicht entladenen Individuen der Population 63 war annähernd gleich. Hier kann man vermuten, dass das über den Phloemsaft aufgenommene TYLCV annähernd vollständig von den Darmzellen resorbiert wurde, weil die mit dem Phloemsaft aufgenommenen TYLCV offensichtlich die Translokationskapazitäten des Mitteldarms nicht übersteigen. Demgegenüber zeigte



sich bei der TYLCV-Quantifizierung der Population 95, dass die entladenen Individuen im Median einen um den Faktor 4,94 signifikant geringeren Virusgehalt hatten. Eine Differenz, die mit  $6,843 \times 10^4$  Viren pro Individuum quantifiziert werden konnte. Sie spiegelt die Virusmenge wieder, die sich im Verdauungstraktlumen der Insekten befanden. Population 95 nahm signifikant weniger TYLCV auf als Population 63.

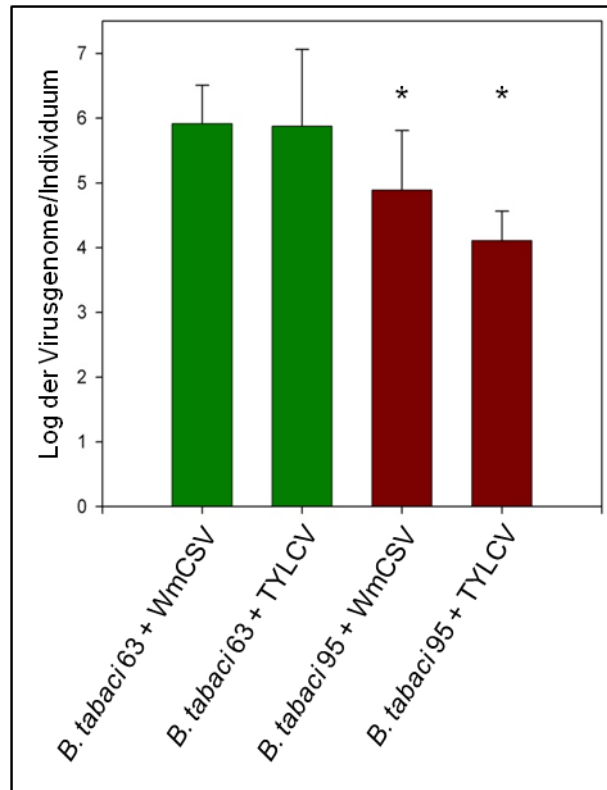
Für beide Populationen konnte festgestellt werden, dass der WmCSV-Gehalt in Insekten weit über dem des TYLCV-Gehalts lag. Dies lässt sich vor allem mit der Viruskonzentration in den Wirtspflanzen erklären, die bei Wassermelonen ca.  $1,26 \times 10^9$  Genome pro 100 ng DNA und bei Tomaten  $6,78 \times 10^7$  Genome pro 100 ng DNA betrug.

### 3.2.3 Virusaufnahme aus artifiziellem Medium

Um zu beweisen, dass der unterschiedliche Virusgehalt in den Weiße Fliegen auf Konzentrationsunterschiede der Viren in den Wirtspflanzenspezies beruht, wurden gereinigte Virionpräparate von WmCSV und TYLCV äquilibriert ( $1,25 \times 10^8$  Viren/ $\mu$ l Saccharoselösung) und in einer Nährlösung zur Aufnahme durch *B. tabaci* Insekten verabreicht.

Die Quantifizierung der Viren in den Populationen 63 und 95 ließ keine signifikanten Unterschiede in der Virusaufnahme erkennen (Abb. 3.3) und somit sind die beobachteten Konzentrationsunterschiede auf unterschiedliche Viruskonzentrationen in den spezifischen Wirtspflanzen zurückzuführen.

Wie in der Quantifizierung mit Pflanzen als Virusquelle (s. Punkt 3.2.2), war der Gehalt an TYLCV in Population 95 signifikant geringer als in Population 63. Die in vorherigen Quantifizierungen beobachtete Tendenz, dass Population 95 ebenfalls weniger WmCSV aufnimmt, wurde bestätigt.

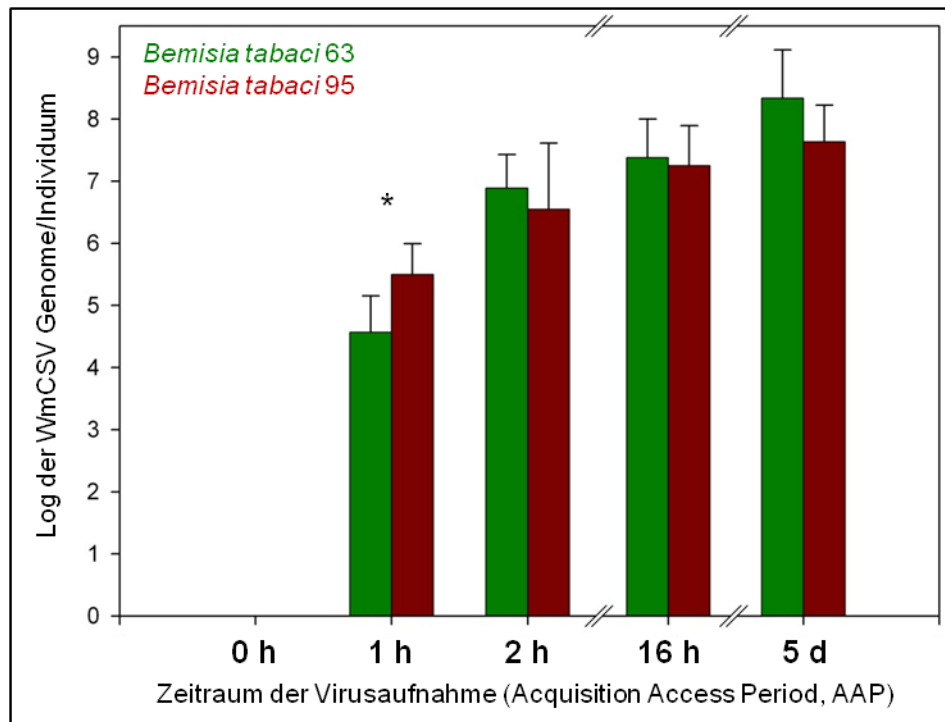


**Abbildung 3.3: Virusgenome pro Individuen von *B. tabaci* Population 63 und 95 nach 48 h Fütterung von WmCSV und TYLCV in gleichen Konzentrationen und anschließender Entladung für 48 h.** Die Daten errechnen sich aus Mittelwerten und zugehörigen Standardabweichungen der normierten logarithmierten Einzelwerte (Tab. 6.3; n = 12, N = 48). \* Signifikanter Unterschied zwischen den Populationen.

### 3.2.4 Menge der Virusaufnahme nach Hungerstress

In den vorangegangenen Versuchen wurde festgestellt, dass sich die aufgenommenen Virusmengen zwischen den *B. tabaci* Populationen 63 und 95 signifikant unterschieden. In diesen Experimenten sollte nun untersucht werden, ob dies auf ein unterschiedliches Saugverhalten zurückzuführen ist.

Dazu wurden synchronisierten 5 Tage alte Weiße Fliegen der Populationen 63 und 95 für eine Zeitspanne von 6 Stunden gehungert. Anschließend wurden die Weiße Fliegen auf virusinfizierte Wirtspflanzen übertragen, woraufhin die Insekten sofort an den Pflanzen zu saugen begannen. Nach 0, 1, 2, und 16 Stunden, sowie nach 5 Tagen, wurden die aufgenommenen Virusmengen von 3 Gruppen zu je 100 Insekten, sowie von je 2 Individuen bestimmt. Die bestimmten Viruskonzentrationen der Gruppen bzw. Individuen unterschieden sich nicht signifikant (Abb. 3.4).



**Abbildung 3.4: Aufnahme von WmCSV durch die Populationen 63 und 95 nach vorangegangenem Hungerstress.** Zu 5 verschiedenen Zeitpunkten wurden die Viren, in nicht entladenen Insekten, quantifiziert. Eine Säule ergibt sich aus Mittelwert und Standardabweichung der logarithmierten Einzelwerte von 3 Parallelen mit jeweils 100 vereinigten Individuen und 2 Parallelen mit jeweils einem Individuum ( $n = 3$ ,  $n = 2$ ,  $N = 302$ ; Tab. 6.4). \* Signifikanter Unterschied zwischen den Populationen.

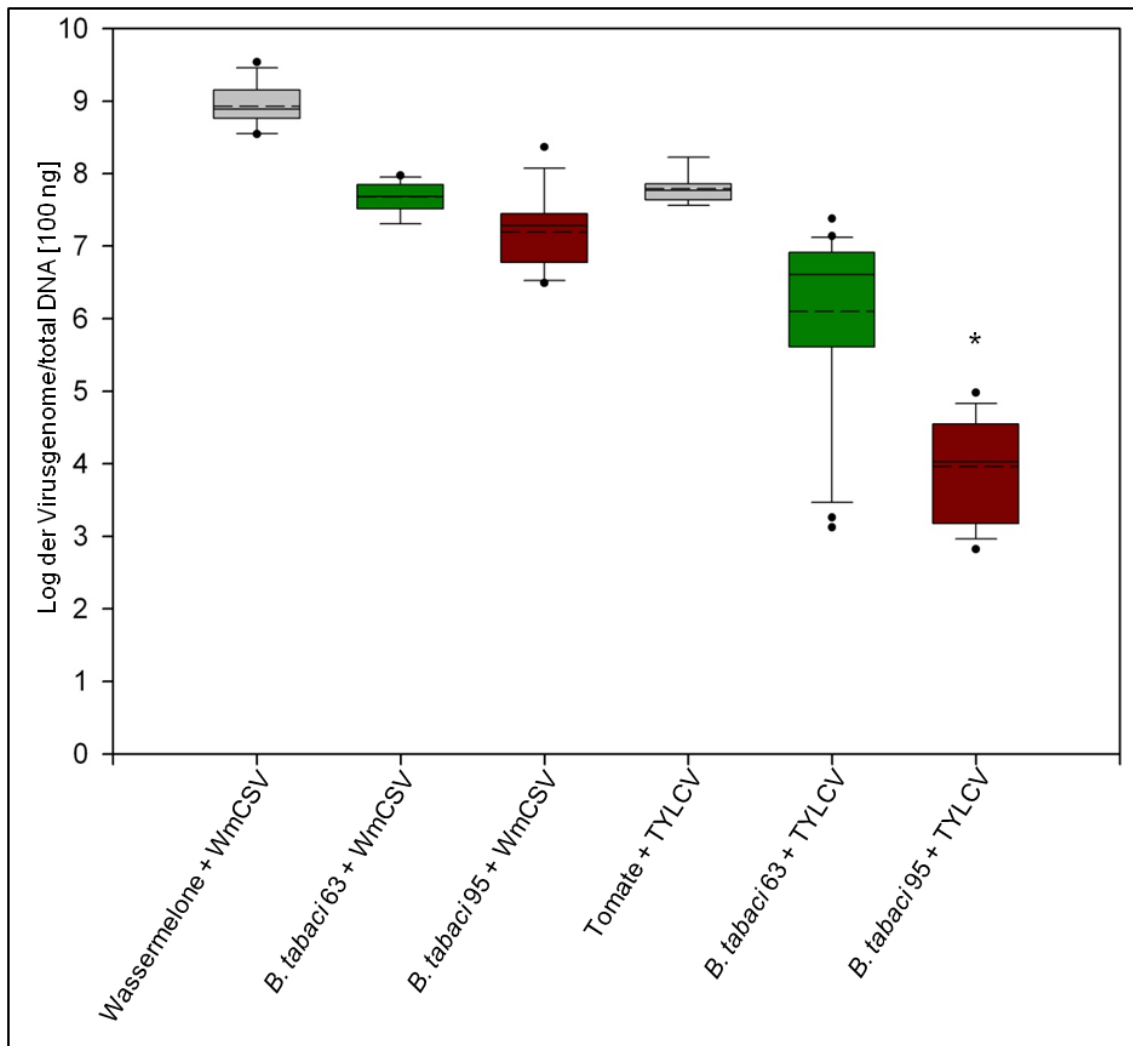
Bereits nach einer Stunde war in Individuen der Population 63/95 mehr als  $7 \times 10^4 / 5 \times 10^5$  Viren nachweisbar. Danach nahm der Virusgehalt in beiden Populationen kontinuierlich zu. Über einen Beobachtungszeitraum von 5 Tagen gab es keine signifikanten Unterschiede in der Virusaufnahme zwischen Population 63 und 95. Nach 5 Tagen waren die aufgenommenen WmCSV Mengen in Individuen der Population 95 etwas geringer als die der Population 63 (vergleiche Punkt 3.2.3), Unterschiede, die jedoch nicht signifikant waren.

Damit können die großen Unterschiede in der Effizienz der Virusübertragung zwischen den Insektenpopulationen nicht mit unterschiedlichem Saugverhalten erklärt werden.

### 3.2.5 Absolute Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Individuen der *B. tabaci* Populationen 63 und 95

Die mittels qPCR bestimmte Virusmenge in Wirtspflanzen (grau) und Individuen von *B. tabaci* der Populationen 63 (grün) und 95 (braun) wird in Abbildung 3.5 in einem Boxplot-Diagramm dargestellt. Die Mediane stellen die in den Individuen enthaltenen

Virusmengen am ehesten dar, da Mittelwerte stark durch Ausreißer verfälscht sind. Signifikante Unterschiede wurden mittels t-Tests ermittelt.



**Abbildung 3.5: Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Wirtspflanzen und gesamten Individuen von *B. tabaci* Population 63 und 95.** Die Boxplots ergeben sich aus Daten, von drei Wiederholungen mit jeweils sechs Parallelen (biologische Repliken,  $n = 18$ ). Jede Parallele wurde in der qPCR einer Doppelbestimmung unterzogen (technische Parallele,  $N = 72$ ). Die Boxen repräsentieren den Bereich in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die Antennen definieren 95 % aller Daten. Die Punkte stellen Ausreißer dar. Die durchgehende horizontale Linie repräsentiert den Median, die gestrichelte Linie den Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte (s. Tab. 6.5). Die logarithmische y-Achseneinteilung wurde vorgenommen, um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten. \* Signifikanter Unterschied zwischen den Populationen.

In Individuen von Population 63 wurden als Median rund  $4,7 \times 10^7$  Genome WmCSV nachgewiesen. Der Median des Gehalts an TYLCV lag mit ca.  $4,1 \times 10^6$  Genomen pro Individuum niedriger, was durch die Viruskonzentration in der Wirtspflanze begründet ist (siehe Punkt 3.2.3). Der Virusgehalt in 100 ng Pflanzen-DNA war für TYLCV und für WmCSV etwa 14-mal höher, als in der entsprechenden Insekten-DNA.

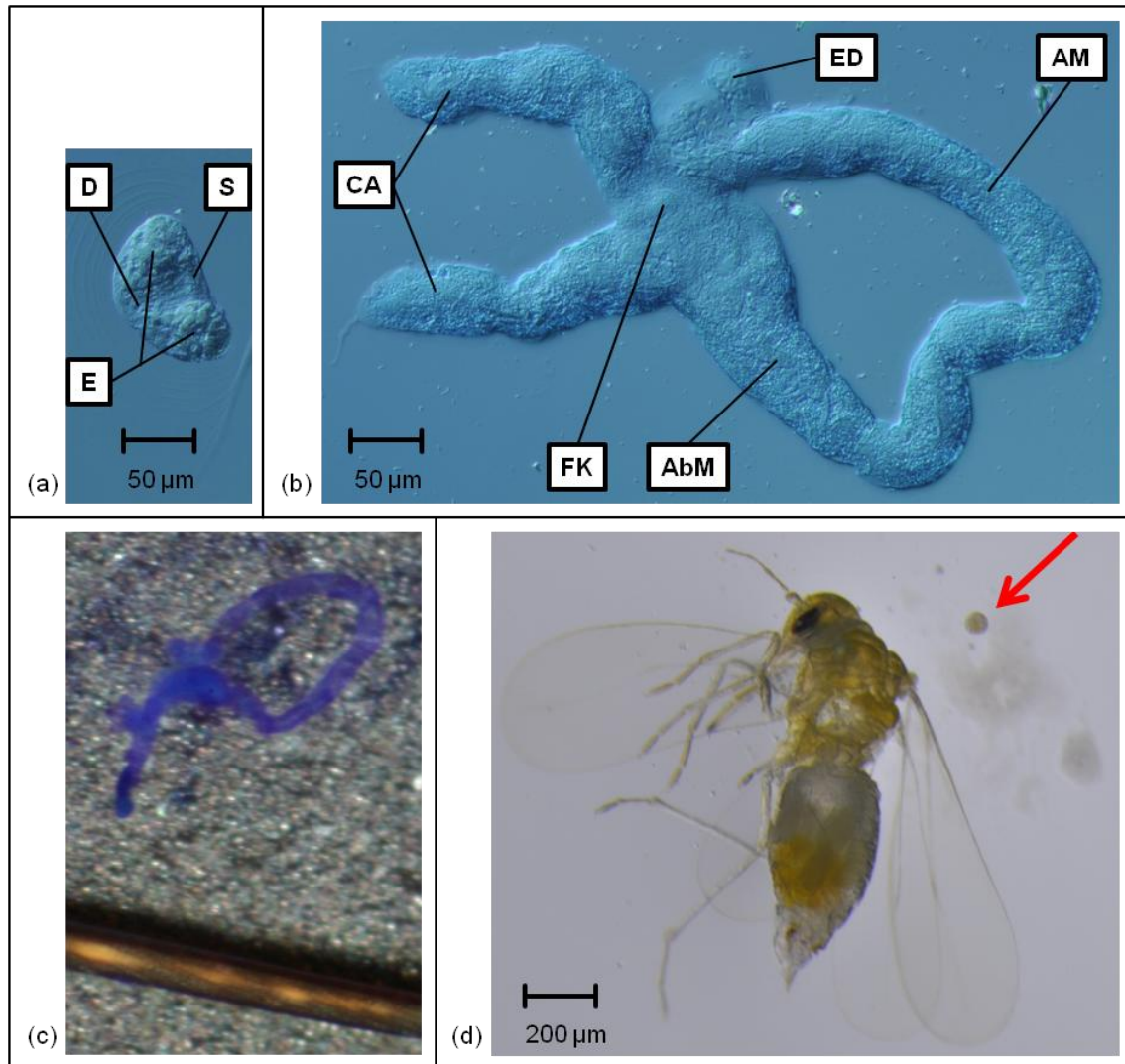
Im Gegensatz zu Individuen der Population 63, war der Gehalt beider Viren in der Insektenpopulation 95 deutlich geringer. Hier unterscheiden sich aber vor allem die für TYLCV gemessenen Viruskonzentrationen signifikant. Der Median des TYLCV-Gehalts betrug in Population 95 rund 10400 Genome pro durchschnittlichem Individuum und damit nur 0,26 % des TYLCV-Gehaltes von Individuen der Population 63.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass für die Passage von TYLCV schon der Mitteldarm eine starke Barriere darstellt.

### **3.2.6 Präparation von Mitteldärmen, Speicheldrüsen und Hämolymphe aus *B. tabaci***

Zur Untersuchung der potentiellen Barrieren innerhalb der Insekten, wurden Mitteldärme, primäre Speicheldrüsen, sowie Hämolymphe aus virustragenden und virusfreien Individuen präpariert (Abb. 3.6).

Die Speicheldrüsen befinden sich im Prothorax von *B. tabaci*. Es wird zwischen primären und akzessorischen Speicheldrüsen unterschieden. Die zwei akzessorischen Speicheldrüsen sind wesentlich kleiner als die primären Speicheldrüsen. Sie wurden in dieser Arbeit nicht betrachtet, da sie nach bisherigem Kenntnisstand keine Funktion bei der Virusübertragung besitzen. An der nierenförmigen primären Speicheldrüse der Abbildung 3.6 ist deutlich die zentrale sekretorische Region zu erkennen, die von den zwei massiveren Endkappen begrenzt wird, so wie es auch von Cicero und Brown (2011) bereits beschrieben wurde. Die Nomenklatur des Mitteldarms orientiert sich an der Veröffentlichung von Ghanim *et al.* aus dem Jahre 2001(b). Die Bestimmung des pH-Wertes der Hämolymphe mittels Spezialindikatorpapier zeigte, gleichermaßen für Population 63 und 95, einen pH-Wert zwischen 5,7 und 5,9. Ein unterschiedlicher pH-Wert der Hämolymphe als Ursache für die unterschiedlichen Übertragungsraten, wurde daher als unwahrscheinlich eingeschätzt.

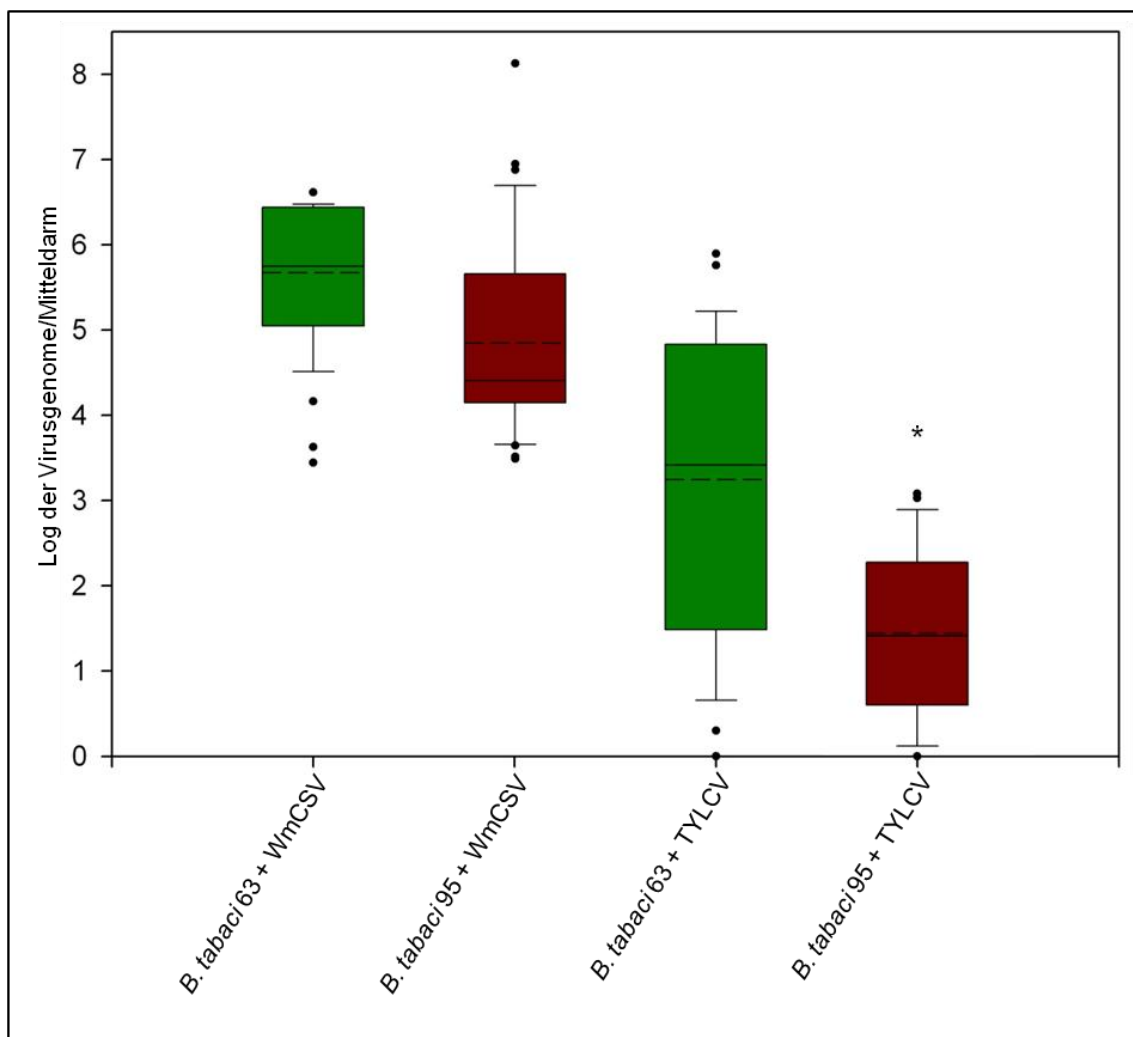


**Abbildung 3.6: Speicheldrüsen, Mitteldärme und Hämolymphe von *B. tabaci*.**  
 (a) Speicheldrüse aufgenommen im differenziellen Interferenzkontrast. D ductale Sektion der zentralen Region, E Endkappen, S sekretorische Sektion der zentralen Region. (b) Mitteldarm aufgenommen im differenziellen Interferenzkontrast des Lichtmikroskops. AbM absteigender Mitteldarm, AM aufsteigender Mitteldarm, CA caeca (Blinddärme), ED Enddarm, FK Filterkammer. (c) Mitteldarm mit Toluidinblau gefärbt. Aufnahme im Hellfeld ohne Kontrast. Zu sehen ist außerdem ein Stück der Wimper mit der der Mitteldarm präpariert wurde. (d) *B. tabaci* im Hellfeld innerhalb eines Mineralöltropfens mit extrahierten sphärischen Hämolymphe-Tropfen (roter Pfeil).

### 3.2.7 Absolute Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen von *B. tabaci* Population 63 und 95

#### Virusgehalt in Mitteldärmen

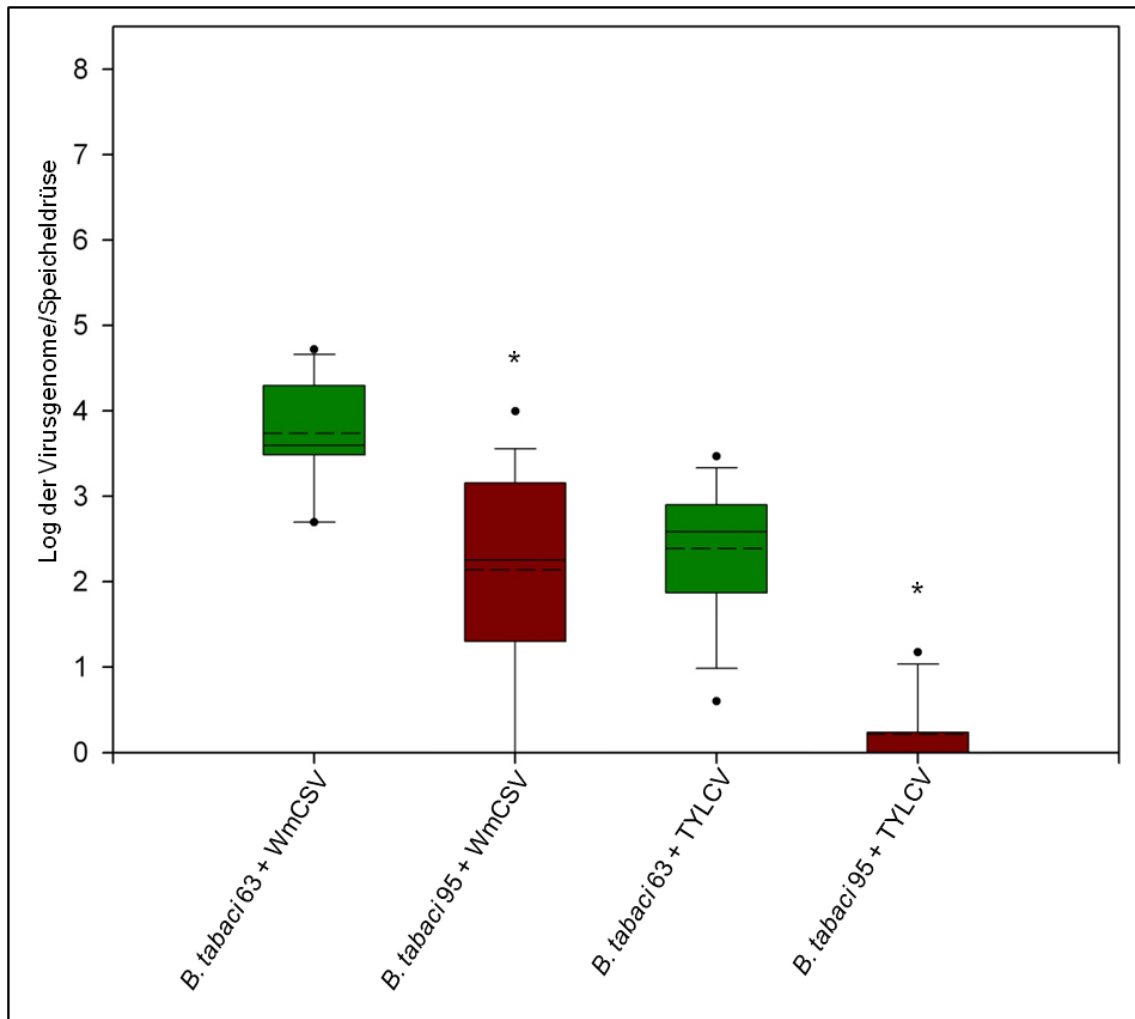
Der Virusgehalt des Mitteldarms war für WmCSV höher als für TYLCV (Abb. 3.7). Der Median der Quantifizierungsdaten für TYLCV in Population 63 lag um das rund 200-fache über den Werten von Population 95. Auch diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die äußere Membran des Mitteldarms in Population 95 eine starke Barriere für TYLCV darstellt.



**Abbildung 3.7: Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Mitteldärmen von *B. tabaci* Population 63 und 95.** Die Boxplots ergeben sich aus Daten, von drei Wiederholungen mit jeweils 12 Parallelen (biologische Repliken, n = 36). Jede Parallele wurde in der qPCR einer Doppelbestimmung unterzogen (technische Parallele, N = 216). Die Boxen repräsentieren den Bereich in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die Antennen definieren 95 % aller Daten. Die Punkte stellen Ausreißer dar. Die durchgehende horizontale Linie repräsentiert den Median, die gestrichelte Linie den Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte (Tab. 6.5). \* Signifikanter Unterschied zwischen den Populationen.

### Virusgehalt in primären Speicheldrüsen

Abbildung 3.8 zeigt ein Boxplot Diagramm, in dem die erhaltenen Quantifizierungsdaten für WmCSV und TYLCV aus primären Speicheldrüsen als logarithmische Werte angegeben sind. In den Speicheldrüsen der Population 63 lag der Virusgehalt an WmCSV, wie schon bei gesamten Insekten und Mitteldärmen beobachtet, höher als der von TYLCV.



**Abbildung 3.8: Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in primären Speicheldrüsen von *B. tabaci* Population 63 und 95.** Die Boxplots ergeben sich aus Daten, von vier Wiederholungen mit jeweils 5 Parallelen (biologische Repliken, n = 20). In jeder Parallele befanden sich 10 vereinigte Speicheldrüsen. Jede Parallele wurde in der qPCR einer Doppelbestimmung unterzogen (technische Parallele, N = 400). Die Boxen repräsentieren den Bereich in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die Antennen definieren 95 % aller Daten. Die Punkte stellen Ausreißer dar. Die durchgehende horizontale Linie repräsentiert den Median, die gestrichelte Linie den Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte (Tab. 6.5). Die logarithmische y-Achseinteilung wurde vorgenommen, um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten. \* Signifikanter Unterschied zwischen den Populationen.



Der berechnete WmCSV Gehalt in primären Speicheldrüsen der Population 95 ( $1,8 \times 10^2$  Virusgenome pro Speicheldrüse) lag in der gleichen Größenordnung wie der TYLCV-Gehalt in der gut übertragenden Population 63 ( $3,8 \times 10^2$ ).

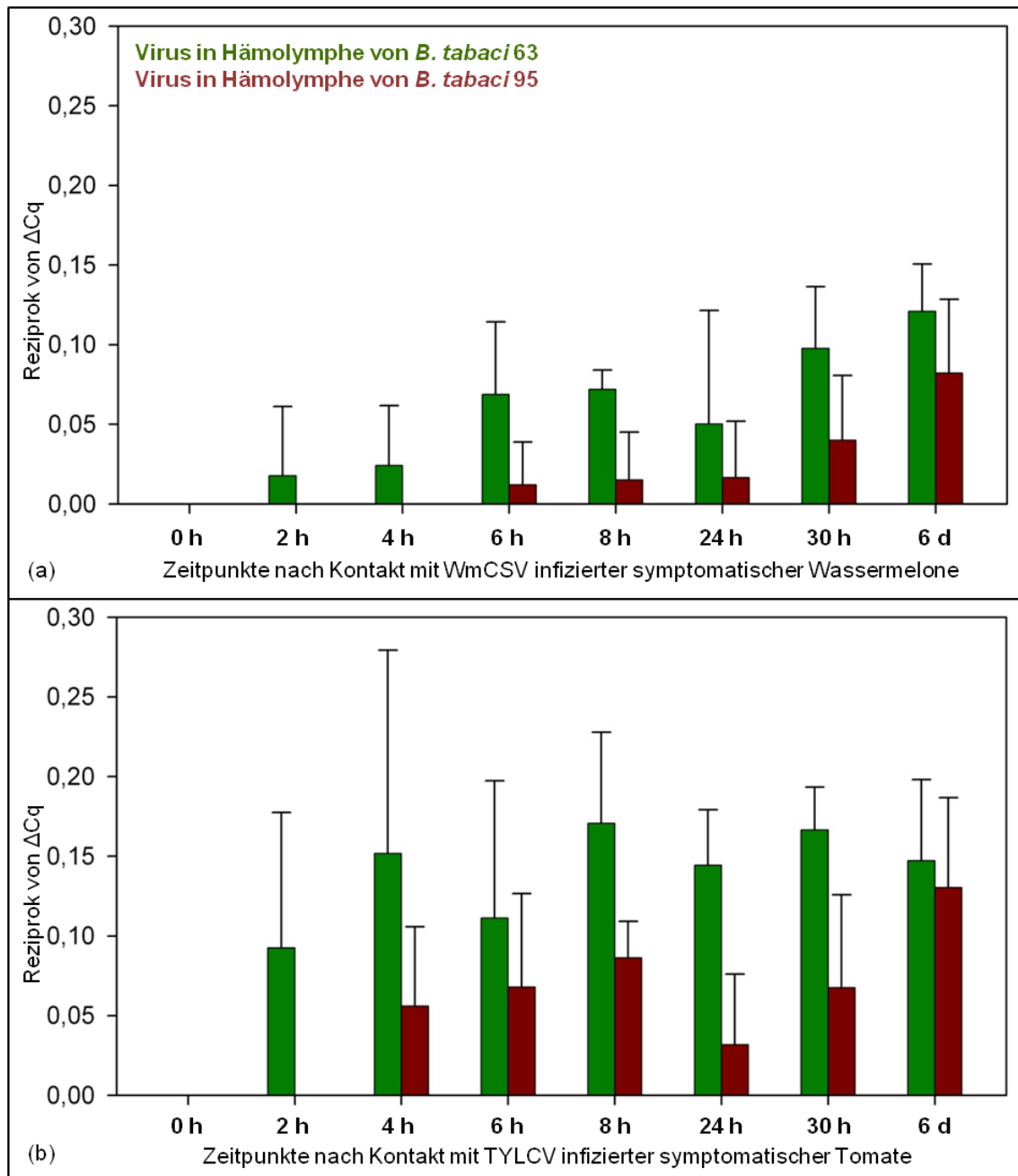
TYLCV-Genome wurden in nur sehr geringen Mengen in den Speicheldrüsen von virustragenden Individuen der Population 95 gefunden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Schlussfolgerung, dass der Mitteldarm in dieser Population für die von den Pflanzen aufgenommene Menge an TYLCV, bereits die wesentliche Barriere darstellt.

### **3.2.8 Relative Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus Hämolymphe**

Da es technisch nicht möglich war, ein definiertes Volumen an Hämolymphe aus den Weiße Fliegen zu extrahieren, wurde eine relative Quantifizierung der darin befindlichen Virusgenome vorgenommen. Um einen Überblick zu bekommen, wann die Begomoviren erstmals in der Hämolymphe nachweisbar sind, wurde die Quantifizierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Transfer der Insekten auf symptomatische Wirtspflanzen vorgenommen. Um Ergebnisse der relativen Quantifizierung und somit die Aufnahme von WmCSV und TYLCV in die Hämolymphe, über den Zeitraum von 6 Tagen, richtig zu deuten, sind die Mittelwerte (Abb. 3.9, Tab. 6.6) und Mediane (Tab. 3.2) zu betrachten.

Bei beiden Populationen konnten WmSCV und TYLCV den Darm passieren und in die Hämolymphe eindringen. Über die gesamte Zeitspanne lässt sich die Aussage treffen, dass im Durchschnitt der Gehalt beider Virusgenome, trotz der großen Standardabweichungen, in der Hämolymphe von Population 63, signifikant höher war, als in der Population 95.

Viren waren in der Hämolymphe von Insekten der Population 63 bereits 2 Stunden nach Transfer detektierbar, wohingegen bei Population 95 erst nach 4 bis 6 Stunden Viren in der Hämolymphe nachzuweisen waren (Abb. 3.9). Die hohe Standardabweichung innerhalb der ersten 6 Stunden lässt erkennen, dass der Eintritt der Viren in die Hämolymphe nicht zeitlich synchron verlief. Die Mediane machen deutlich, dass nach 6 Stunden mehr als 50 % der Individuen von Population 63 detektierbare Mengen an WmCSV aufgenommen hatten, während dies bei Population 95 erst nach 24 Stunden der Fall war.



**Abbildung 3.9: Relative Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus Hämolymphe von *B. tabaci* 63 und 95.** Virusfreie fünf Tage alte Weiße Fliegen wurden auf symptomatische Wirtspflanzen übergesetzt. Zu acht verschiedenen Zeitpunkten wurde sechs Mal aus fünf Individuen die Hämolymphe extrahiert und vereinigt ( $n = 6$ ,  $N = 240$ ). Die Begomoviren wurden relativ quantifiziert, mit der 18S DNA von *B. tabaci* als Referenzgen. (a) Relative Quantifizierung von WmCSV. (b) Relative Quantifizierung von TYLCV.

Der WmCSV-Gehalt (nach Mittelwert) stieg innerhalb von 22 Stunden nach erstmaliger Detektion um den Faktor 2304,2 an, während der Anstieg in Population 95 nur langsam erfolgte (Faktor: 41,9 in 24 Stunden). Der TYLCV-Gehalt stieg in Population 63 in den 2 Stunden nach erstmaliger Detektion um das 32,5-fache an. Nach weiteren 22 Stunden nochmals um den Faktor 5,6. Bei Population 95 waren erst nach 6 Tagen erhöhte Werte feststellbar. Ursache für die Verzögerung und den langsameren Anstieg

in Population 95 war, dass sowohl für WmCSV als auch für TYLCV die Mitteldärme Barrieren darstellten, deren Überwindung, durch nachweisbare Virusmengen, mehr Zeit in Anspruch nahm, als in Population 63, dessen Mitteldärme keine Barriere darstellten.

Die erhöhten TYLCV-Mittelwerte in Population 95 nach 6 Tagen waren nicht signifikant von Population 63 zu unterscheiden ( $t = 0,55$ ). Der wesentlich geringere Median (Tab. 3.2) nach 6 Tagen, deutet an, dass die Mittelwerte von einzelnen Individuen, die viele Viren in der Hämolymphe trugen, verfälscht wurden. Ein Hinweis, dass es sich bei Population 95 um eine Mischpopulation von gut und schlecht übertragenden Individuen handelt.

### 3.3 Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in *B. tabaci*

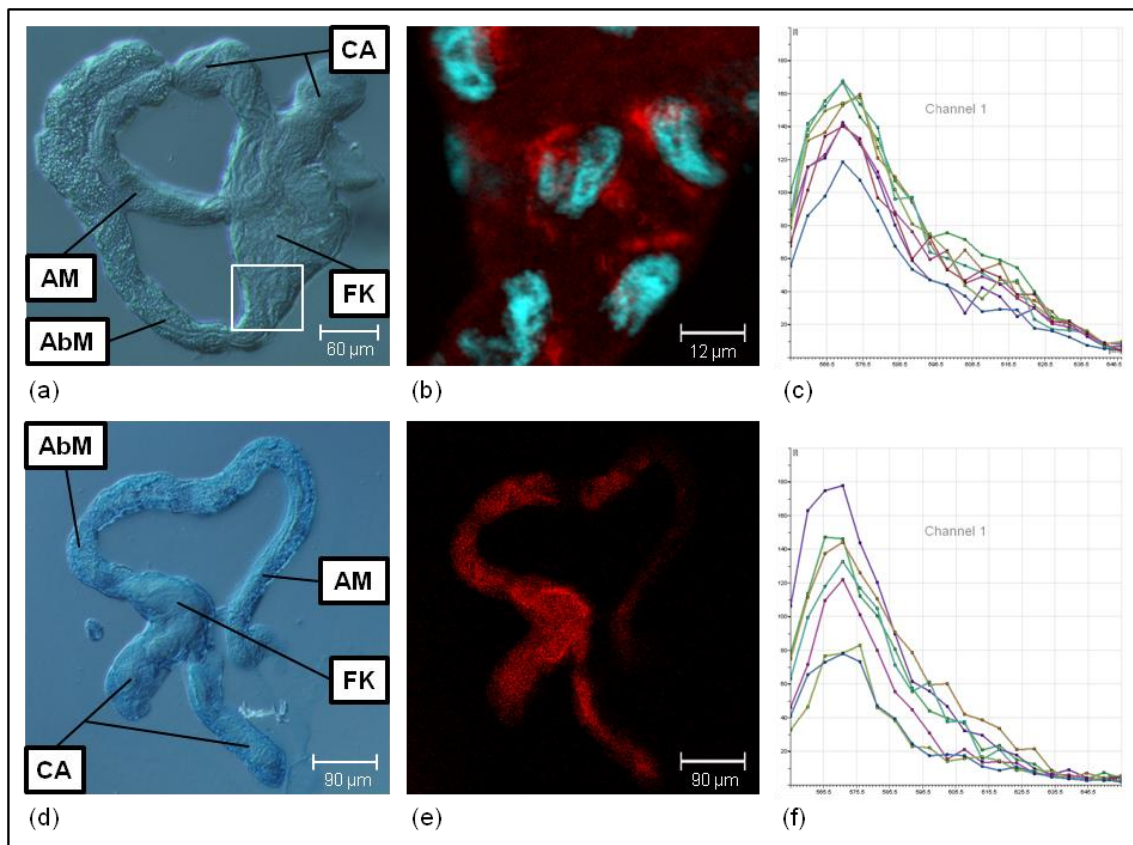
Nach der Quantifizierung der Begomoviren in Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen, wurden die Viren in diesen Organen lokalisiert. Dazu wurde die DNA der Viren mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) nachgewiesen. Die Insekten wurden hierfür für fünf Tage auf virusinfizierten Pflanzen und anschließend zur Dekontamination der Verdauungstrakte für zwei Tage auf Nicht-Wirtspflanzen gehalten.

#### 3.3.1 Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in Mitteldärmen von *B. tabaci*

In den Mitteldärmen von *B. tabaci* der Population 63 und 95 ließ sich die DNA von WmCSV in den Filterkammern, den absteigenden Mitteldärmen und den Blinddärmen (*caeca*), durch ein starkes Fluoreszenzsignal der Sonde gekennzeichnet, lokalisieren (Abb. 3.10). Im aufsteigenden Mitteldarm war das Signal oft schwächer. In beiden Populationen traten die Signale zumeist in einer Vielzahl kleiner Flecken (Spots) auf, die ein Mosaik aus stark und schwach fluoreszierenden Stellen bildeten. Die Spots waren in Zellkernnähe konzentrierter, als im übrigen Lumen der Zellen, jedoch nie im Inneren der Zellkerne aufzufinden. In 88,6 Prozent der untersuchten Mitteldärme der Population 63 war WmCSV in diesem Spots nachzuweisen.

In *B. tabaci* der Population 95 war das Signal der Sonde meist schwächer ausgeprägt als in Mitteldärmen der Population 63. In 64,3 % der untersuchten Mitteldärme wurde das Sondensignal in den Spots nachgewiesen. Eine Erklärung der Beobachtung liefern die Quantifizierungsdaten der *real-time* PCR. Der Gehalt an WmCSV in den Individuen der Population 95 schwankte von einigen tausend Molekülen pro Mitteldarm bis zu Molekülzahlen, die annähernd Größenordnungen erreichten, wie

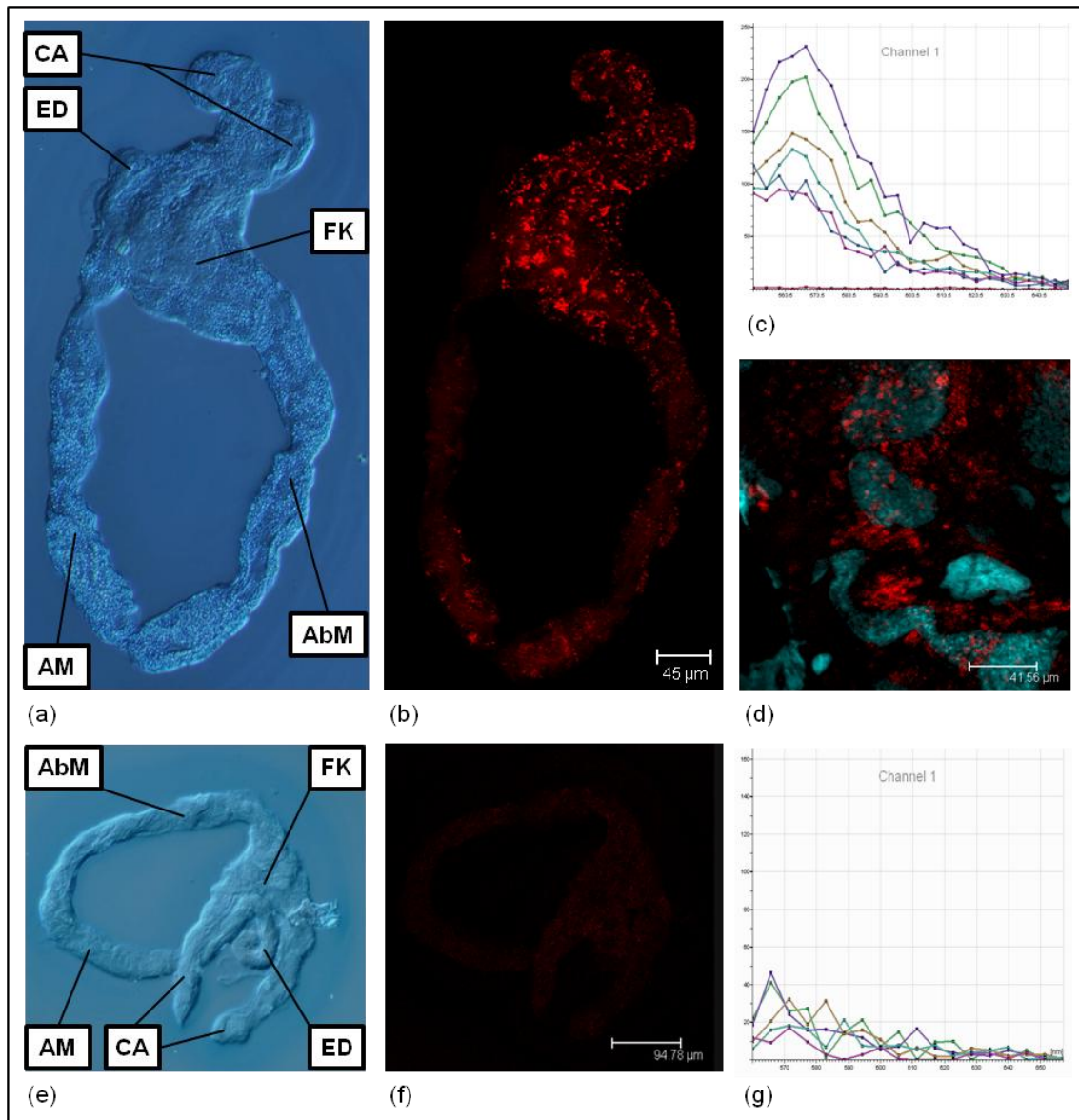
sie in Mitteldärmen der Population 63 enthalten waren. Geringe Molekülzahlen, die sich über den Mitteldarm verteilten, waren also nicht mehr mit dem verwendeten Fluoreszenzmikroskop detektierbar. Demgegenüber war TYLCV sehr gut auch in geringen Mengen nachweisbar, was möglicherweise durch die verwendete Sonde erklärt werden kann. Die Sonde war von TYLCV Sequenzen abgeleitet, die auch mit WmCSV hybridisieren, jedoch nicht vollständig homolog sind. Die mittels qPCR gemessene und durchschnittlich in den Mitteldarm aufgenommene WmCSV-Menge war um ein Vielfaches höher, als die durchschnittlich aufgenommene TYLCV-Menge. Die für TYLCV und WmCSV nahezu identischen Fluoreszenzsignale der FISH-Sonde sind ein Indiz dafür, dass die Sonde für WmCSV weniger spezifisch ist. Sie zeigen aber auch, dass FISH für die Quantifizierung von Nukleinsäure nicht geeignet ist.



**Abbildung 3.10: Lokalisierung von WmCSV in Mitteldärmen von Weibchen der *B. tabaci* Populationen 63 und 95 durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.**

(a) Mitteldarm eines Individuums von Population 63 im differentiellen Interferenzkontrast. AbM absteigender Mitteldarm, AM aufsteigender Mitteldarm, CA caeca (Blinddarm), FK Filterkammer. (b) Ausschnitt aus (a) als Überlagerung der DAPI-Detektion (türkisfarben) und dem Sondennachweis (rot). Sonden in Spots geballt besonders in Zellkernnähe lokalisiert. (c)  $\lambda$ -Scan zu (b) mit einem Maximum von ca. 570 nm. (d) Mitteldarm eines Individuums von Population 95 im differentiellen Interferenzkontrast. (e) Fluoreszenzscan von (d) zum Nachweis von Cy3, nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm), mit starkem Signal in der Filterkammer, dem absteigenden Mitteldarm und dem Blinddärmen. (f)  $\lambda$ -Scan zu (e) mit einem Maximum von ca. 570 nm.

Der Nachweis von TYLCV in Population 63 stellte sich, wie bereits erwähnt, ähnlich dar, wie der von WmCSV. Hier wurden in 94,7 % der untersuchten Mitteldärme Spots nachgewiesen, die sich wie oben beschrieben im Mitteldarm verteilt. Auch hier trat das Signal der Sonde verstärkt in Zellkernnähe auf (Abb. 3.11).



**Abbildung 3.11: Lokalisierung von TYLCV in Mitteldärmen von Weibchen der *B. tabaci* Populationen 63 und 95 durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.** (a) Mitteldarm eines Individuums von Population 63 im differentiellen Interferenzkontrast. AbM absteigender Mitteldarm, AM aufsteigender Mitteldarm, CA caeca (Blinddarm), ED Enddarm, FK Filterkammer. (b) Fluoreszenzscan von (a) zum Nachweis von Cy3 (rot), nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm), mit starken Spot-Signalen in der Filterkammer, dem absteigenden Mitteldarm und dem Blinddärmen. (c) λ-Scan zu (b) mit einem Maximum von ca. 570 nm. (d) Ausschnitt einer Filterkammer aus Population 63 mit DAPI-gefärbten Zellkernen (türkisfarben) und Cy3-Detektion. Sonde besonders um die Zellkerne lokalisiert. (e) Mitteldarm eines Individuums von Population 95 im differentiellen Interferenzkontrast. (f) Fluoreszenzscan von (e) zum Nachweis von Cy3. Kein Signal detektiert. (g) λ-Scan zu (f) von 560 nm bis 660 nm Wellenlänge ohne spezifischen Ausschlag.

In keinem der untersuchten Mitteldärme der Population 95 ließen sich TYLCV-Genome nachweisen. Dies deckt sich mit den Daten der qPCR, in der im Mittel weniger als 200 Virusgenome pro durchschnittlichem Mitteldarm der Population 95 quantifiziert wurden, was unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten konfokalen Fluoreszenzmikroskops lag (Abb. 3.11).

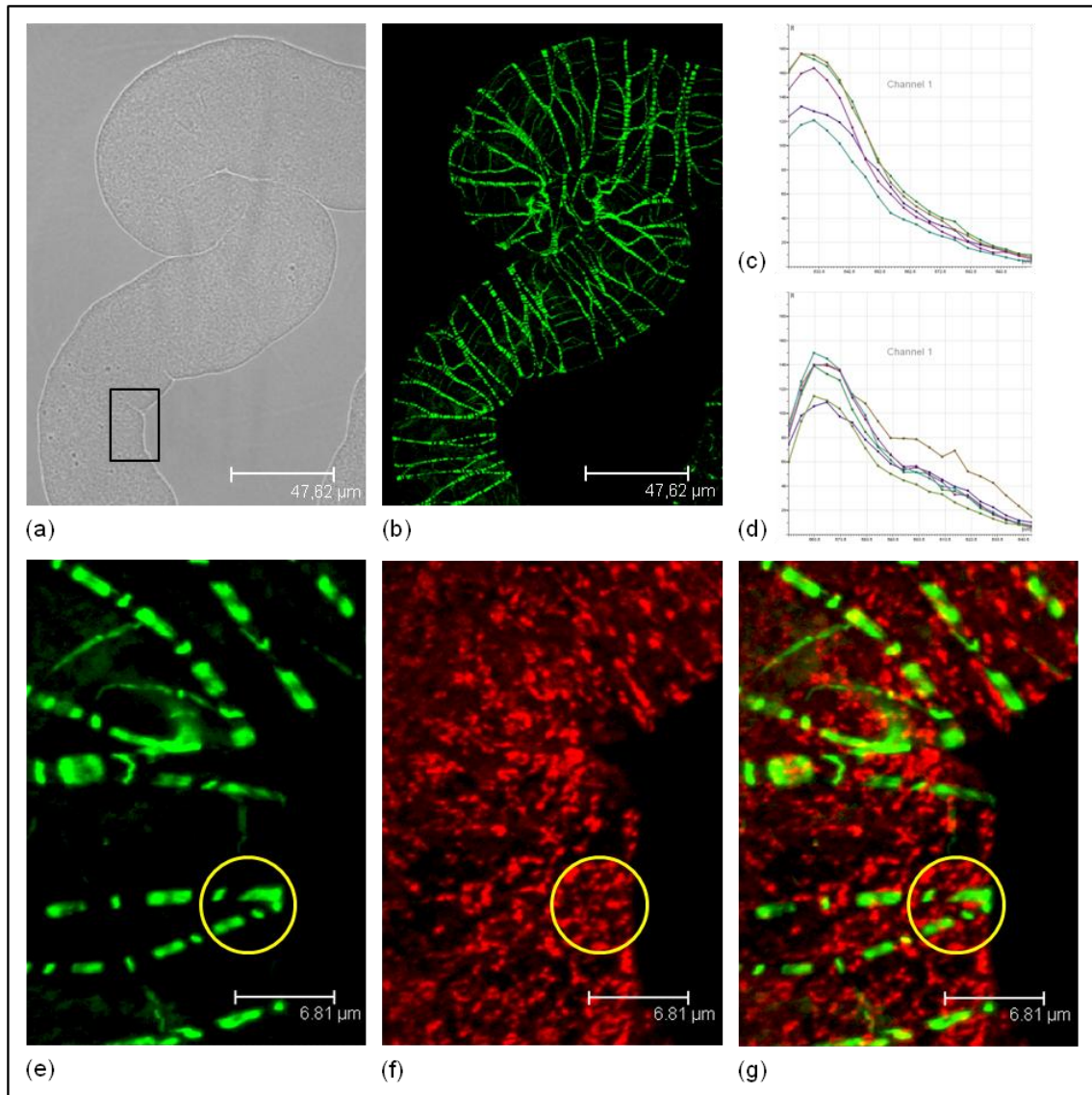
### 3.3.2 Lokalisierung von WmCSV und F-Aktin in Mitteldärmen

Eine Lokalisierung der Muskulatur der Mitteldärme, durch Anfärben von F-Aktin, gibt weiteren Aufschluss über die Verteilung der Begomoviren. Dazu wurden Mitteldärme von entladenen Insekten verwendet. WmCSV wurde durch Hybridisierung mit einer DNA-Sonde und F-Aktin mittels fluoreszenzmarkiertem Phalloidin detektiert. Der Nachweis der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte unter dem konfokalen Fluoreszenzmikroskop.

In Abbildung 3.12 ist ein Mitteldarm eines Individuums der Population 63 gezeigt. Deutlich, an der typischen Querstreifung zu erkennen, sind die Myofibrillen (grün) der Darmmuskulatur. Das Cy3-Signal der Sonde zum Virusnachweis ist rot dargestellt. Die ca. 1 µm starken Myofibrillen, die unter anderem aus Aktin bestehen, bilden ein Netz, welches sich durch den gesamten Mitteldarm zieht. Die stärkeren Myofibrillen verlaufen hauptsächlich quer zum absteigenden und aufsteigenden Mitteldarm, sowie zu den Blinddärmen. Damit werden kontraktile Bewegungen des Mitteldarms ermöglicht, die den Inhalt des Lumens vorantransportieren. Feinere Strukturen verbinden in Längsrichtung die stärkeren Myofibrillen. Von diesem Aktin-Netz an der inneren Peripherie des Mitteldarms reichen viele feine Aktin-Strukturen in zentrale Bereiche der Mitteldarmzellen. Diese ließen sich nur bei einem gewissen Durchmesser und somit starker Phalloidin-Anlagerung mit dem verwendeten Mikroskop auflösen.

Bei Mitteldärmen von virustragenden Individuen von *B. tabaci*, waren an den Myofibrillen keine Virus-Genome zu lokalisieren. Da das Lumen der Mitteldarmpräparate zusammengefallen war, war ein Darm auf einem Objektträger im Durchschnitt flach und nicht rund, wie in intakten Insekten. Der Raum, den das Zytoplasma unterhalb der Myofibrillen einnehmen konnte, war deshalb wesentlich schmaler als zwischen den Myofibrillen. Daher war das Sondensignal zur Virusdetektion an den Myofibrillen sehr viel schwächer und es entstand das Bild eines Mosaiks aus Spots. Gelbes Signal in der Überlagerung zeigt die Stellen an, an der sich trotz Verdrängung durch die Myofibrillen noch relativ viele Viren auf gleicher Breite befanden. Eine Ko-Lokalisierung von Aktin und WmCSV wurde nicht gefunden.





**Abbildung 3.12: Lokalisierung von Aktin und WmCSV im Mitteldarm von *B. tabaci*.** (a) Absteigender Mitteldarm eines Individuums der Population 63 im Durchlicht, nach fünftägigem WmCSV-Kontakt und anschließender Dekontamination des Verdauungstraktlumens für zwei Tage. (b) Gleicher Mitteldarmausschnitt wie in (a). Detektion von Phalloidin (grün) zum Nachweis von F-Aktin. (c)  $\lambda$ -Scans zu (b) mit einem Maximum bei etwa 525 nm. (d)  $\lambda$ -Scans zu (f) mit einem Maximum bei etwa 570 nm. (e) Ausschnitt aus (b), angezeigt in (a). (f) Gleicher Ausschnitt wie (e) mit Detektion der Cy3-markierten Sonde (rot) zum Nachweis des WmCSV-Genoms. (g) Überlagerung von (e) und (f). Zu erkennen ist keine Ko-Lokalisierung. Dort, wo F-Aktin nachgewiesen wurde, war das Signal zum Nachweis von WmCSV schwächer. Die Mitteldarmbilder in (b), (e) und (f) sind Maximumprojektionen aus jeweils 10 Einzelbildern, mit einer Schichtdicke von jeweils 0,5  $\mu\text{m}$ .

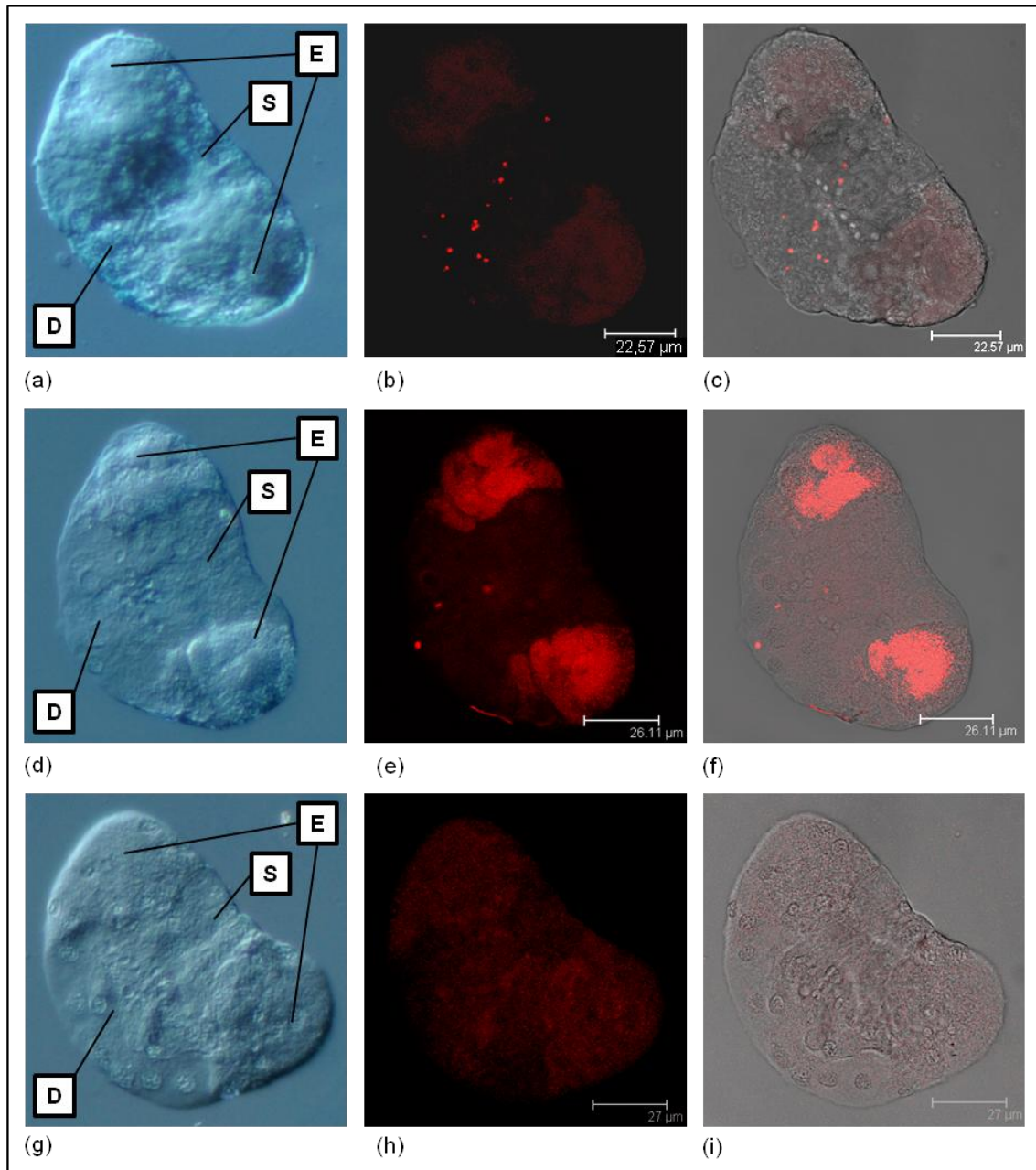
An der durch einen gelben Kreis hervorgehobenen Stelle ist besonders gut zu erkennen, dass sich an dem Ort der Myofibrillen ein viel schwächeres WmCSV-Signal detektieren ließ, als an den Orten direkt daneben. Somit entsteht der Eindruck eines Mosaiks an WmCSV-Spots und es lässt sich schlussfolgern, dass sich an Orten der Myofibrillen keine Viren aufhielten.

### 3.3.3 Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in Speicheldrüsen von *B. tabaci*

Primäre Speicheldrüsen von *B. tabaci* sind in Abbildung 3.13 dargestellt. In den Speicheldrüsen der Population 63 wurde WmCSV DNA als Hybridisierungsspot in der zentralen sekretorischen Region lokalisiert, an die sich der Speichelkanal anschließt. Es ist zu vermuten, dass es sich bei diesen Spots um Speicheltropfen oder Vesikel handelt, in denen Viren konzentriert sind. In ca. 50 % aller Speicheldrüsen war, unabhängig vom Virusnachweis, zusätzlich eine verstärkte gleichmäßige Fluoreszenz in den Endkappen festzustellen. Dabei handelte es sich jedoch um Autofluoreszenz und nicht um ein spezifisches Signal der Sonde.

In 66,7 % der Speicheldrüsen der Population 95 traten die Virus-Spots ebenfalls auf. In den restlichen 33,3 % wurden keine Spots gefunden. Wie bei den untersuchten Mitteldärmen, konnte auch hier ein Versagen der verwendeten Methode aufgrund von Positivkontrollen, welche aus Speicheldrüsen der Population 63 bestanden, ausgeschlossen werden. Eine Erklärung der Beobachtung erhält man auch in diesem Fall, wenn man die Quantifizierungsdaten der qPCR betrachtet. Der Gehalt an WmCSV in den Individuen der Population 95 schwankte von sehr wenigen Molekülen pro Speicheldrüse bis zu Molekülzahlen, die annähernd Größenordnungen erreichten, wie sie in Speicheldrüsen der Population 63 durchschnittlich enthalten waren. Hohe Molekülzahlen bewirkten, dass sich viele Sonden in einer FISH anlagerten. Somit kam ein starkes Fluoreszenzsignal zustande. Bei geringen Virusmengen pro Speicheldrüse reichte die Sensitivität des verwendeten konfokalen Mikroskops nicht aus, um die angelagerten Sonden zu detektieren. Speicheldrüsen sind wesentlich kleiner als Mitteldärme. Quantifizierte Virusmengen befinden sich in einem sehr viel kleineren Volumen. Daher waren geringere Virusmengen in den Speicheldrüsen noch detektierbar, als in Mitteldärmen. Auch die Spezifität der verwendeten Sonde, die bereits bei den Mitteldärmen erläutert wurde, musste hier berücksichtigt werden.

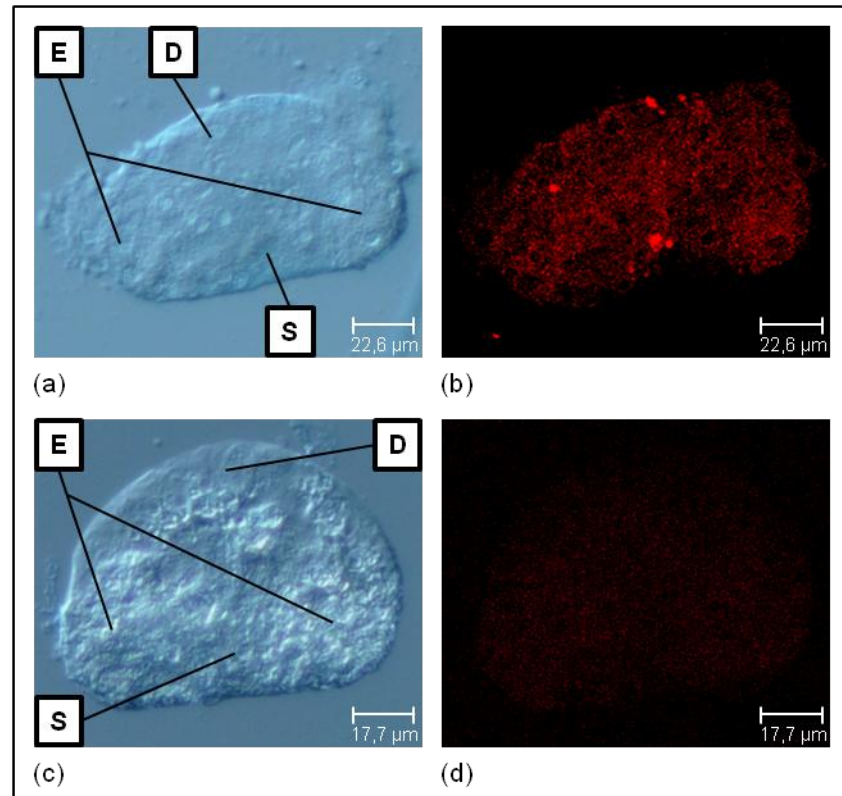




**Abbildung 3.13: Lokalisierung von WmCSV in primären Speicheldrüsen von Weibchen der *B. tabaci* Populationen 63 und 95 durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.**

(a) primäre Speicheldrüse eines Individuums von Population 63 im differentiellen Interferenzkontrast. D ducale Sektion der zentralen Region, E Endkappe, S sekretorische Sektion der zentralen Region. (b) Fluoreszenzscans von (a) zum Nachweis des Cy3-Fluorophors der Sonden (rot), nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm), mit einzelnen Spot-Signalen im zentralen sekretorischen Bereich der Speicheldrüsen. (c) Überlagerungen von (b) mit dazugehörigen Hellfeldscan. (d), (g) primäre Speicheldrüsen zweier Individuen von Population 95 im differentiellen Interferenzkontrast. (e), (h) Fluoreszenzscans von (d) bzw. (g) zum Nachweis des Cy3-Fluorophors der Sonden (rot), nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm). (f), (i) Überlagerungen von (e) bzw. (h) mit den dazugehörigen Hellfeldscans. Deutlich zu erkennen ist in (c) und (f), dass einzelne Spot-Signale in der zentralen sekretorischen Region der Speicheldrüsen lokalisiert waren. In (i) war lediglich ein schwacher Hintergrund zu detektieren.

TYLCV wurde in 87,5 % der Speicheldrüsen von Insekten der Population 63, ebenfalls in den bereits erwähnten Spots, nachgewiesen. Diese waren wiederum in der zentralen sekretorischen Region anzutreffen (Abb. 3.14).



**Abbildung 3.14: Lokalisierung von TYLCV in primären Speicheldrüsen von Weibchen der *B. tabaci* Populationen 63 und 95 durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.** (a) primäre Speicheldrüse eines Individuums von Population 63 im differentiellen Interferenzkontrast. D ducale Sektion der zentralen Region, E Endkappe, S sekretorische Sektion der zentralen Region. (b) Fluoreszenzscans von (a) zum Nachweis des Cy3-Fluorophors der Sonden (rot), nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm), mit einzelnen Spot-Signalen im zentralen sekretorischen Bereich der Speicheldrüsen. (c) primäre Speicheldrüse eines Individuums von Population 95 im differentiellen Interferenzkontrast. (d) Fluoreszenzscans von (c) zum Nachweis des Cy3-Fluorophors der Sonden ohne Signal.

In den Speicheldrüsen von Population 95 Insekten konnte kein TYLCV lokalisiert werden. Auch dies lässt sich mit der sehr geringen Konzentration von Virus-DNA erklären, die schon in den Quantifizierungstests bestimmt wurden. Weil die Passage von TYLCV bereits im Mitteldarm der Insekten dieser Population blockiert wird, waren Viren in den Speicheldrüsen der Individuen auch nicht mehr nachzuweisen, bzw. verblieben unterhalb der Nachweisgrenze.

### 3.4 Selektion einer nicht übertragenden *B. tabaci* Population aus der schwach übertragenden Population 95

#### Infektionsraten von Tomaten

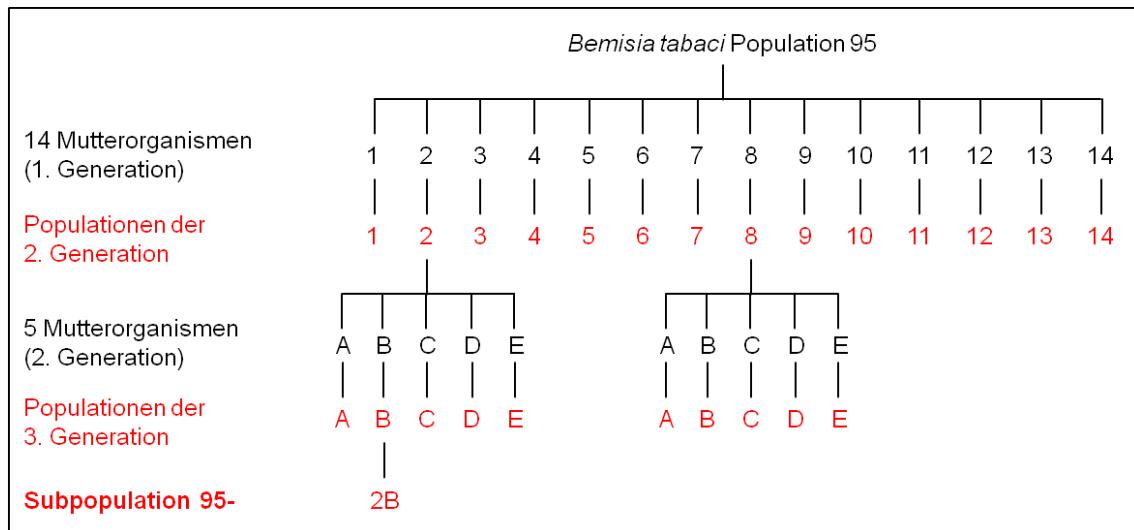
Die Unterschiede in den aufgenommenen Virusmengen zwischen Individuen der Populationen 63 und 95 ließen darauf schließen, dass es sich bei der schwach übertragenden Population 95 um eine Mischpopulation, aus *B. tabaci* Virusvektoren und Insekten handelt, die nicht übertragungskompetent sind. Aus dieser Population 95 sollte eine nicht virusübertragende Subpopulation selektiert werden. Dazu wurden parallel aus jeweils einem eiertragenden weiblichen Tier 14 Populationen herangezogenen und in TYLCV Übertragungsversuchen getestet. Vier Populationen wiesen eine geringere Infektionsrate auf (0 – 12%), als die Ausgangspopulation 95 (15 %). Aus diesen vier Populationen der 2. Generation wurden zwei (Population 2 und 8) ausgewählt, erneut eiertragende Weibchen entnommen, um den Selektionsvorgang zu wiederholen. Die Nachkommen der 3. Generation wurden auf Übertragungskompetenz getestet. Abbildung 3.15 zeigt schematisch die Generationenfolge der Weiße Fliegen, bis zum Erreichen einer Subpopulation, die die Eigenschaft der Virusübertragung vollständig verloren hatte.

Da bereits die Nachkommen-Population B des Weibchens 2 (2. Generation), sowie die Nachkommen-Population A des Weibchens 8 (2. Generation), jeweils eine Übertragungsrate von 0 % aufwiesen, wurden die weiteren Populationen 2C, 2D, 2E, sowie die bis dahin nicht untersuchten Nachkommen der Population 8 (8B bis 8E), nicht weiter untersucht. Die Population 2A wies, wie ihre Eltern-Population der 2. Generation, eine geringe Übertragungsrate (ca. 6 %) auf. Die Population 8A wurde im Verlauf des Versuchs aufgrund von schlechter Reproduktion verworfen.

In virustragenden Insekten der Population 2 (2. Generation) betrugen die absolut gemessenen Virusgehalte eines Individuums nach fünftägiger Fütterung auf TYLCV infizierten, symptomatischen Tomatenpflanzen durchschnittlich  $1,48 \times 10^5 \pm 3,62 \times 10^5$  (Geldokumentation des Virusnachweises: s. Anhang 6.5). Diese Werte entsprachen nicht entladenen Individuen der Ausgangspopulation 95. Von 17 Wirtspflanzen wurde eine symptomatisch. Eine PCR zum Nachweis von TYLCV zeigte, dass ausschließlich diese eine Pflanze virusinfiziert war. Daraus ergab sich eine Infektionsrate von rund 5,9 %.

Die *B. tabaci* Individuen der 3. Generation der Population 2B wiesen durchschnittlich einen absoluten Virusgehalt von  $8,50 \times 10^4 \pm 2,49 \times 10^5$  Moleküle pro Individuum auf. Von 40 Wirtspflanzen, auf die zur Inokulation einzelne Individuen gesetzt wurden, blieben

alle symptomlos. Damit wurden bereits in der 3. Generation Übertragungsinkompetente Insekten selektiert.



**Abbildung 3.15: Schema der gezüchteten Weiße Fliege Populationen aus der Population 95.** Aus 14 einzelnen Weibchen wurden 14 Nachkommen-Populationen gezüchtet (2. Generation). Diese 14 Populationen wurden auf ihre Virusübertragungsraten untersucht. Die Populationen 2 und 8 wiesen eine geringere Übertragungsrate auf als die Ursprungsgeneration. Von diesen Populationen wurden noch einmal eierlegende Weibchen isoliert und deren Nachkommen separat kultiviert (3. Generation). Von den 5 Parallelen der 3. Generation wurde der mit B gekennzeichneten Population eine Übertragungsrate von 0 % zugewiesen. Die meisten der anderen Populationen wurden daraufhin nicht weiter untersucht.

Auch bei Erhöhung der zur Infektion eingesetzten Insektenzahl, blieben die 15 Tomatenpflanzen, die sieben Tage mit einer Gruppe von ca. 300 virustragenden Individuen der Population 2B (3. Generation) inkubiert wurden, über einen Beobachtungszeitraum von vier Wochen symptomlos. Der Nachweis von TYLCV mittels PCR, zeigte in allen 15 Pflanzen ein negatives Ergebnis (nicht gezeigt).

#### Infektionsraten von jungen Wassermelonen

Auch Versuche mit Wassermelonen zur Infektion mit WmCSV mit Individuen der Population 2B verliefen negativ. Ebenso blieben Wassermelonenpflanzen auch nach Infektion mit Gruppen von 20 bis ca. 300 Individuen, in mehreren Wiederholungen symptomlos (Daten nicht gezeigt).

Damit war bewiesen, dass die *B. tabaci* Subpopulation 2B Begomoviren nicht mehr übertragen kann. Sie wurde als *B. tabaci* Population 95- gekennzeichnet.

### 3.4.1 Sekundäre Endosymbionten der Population 95-

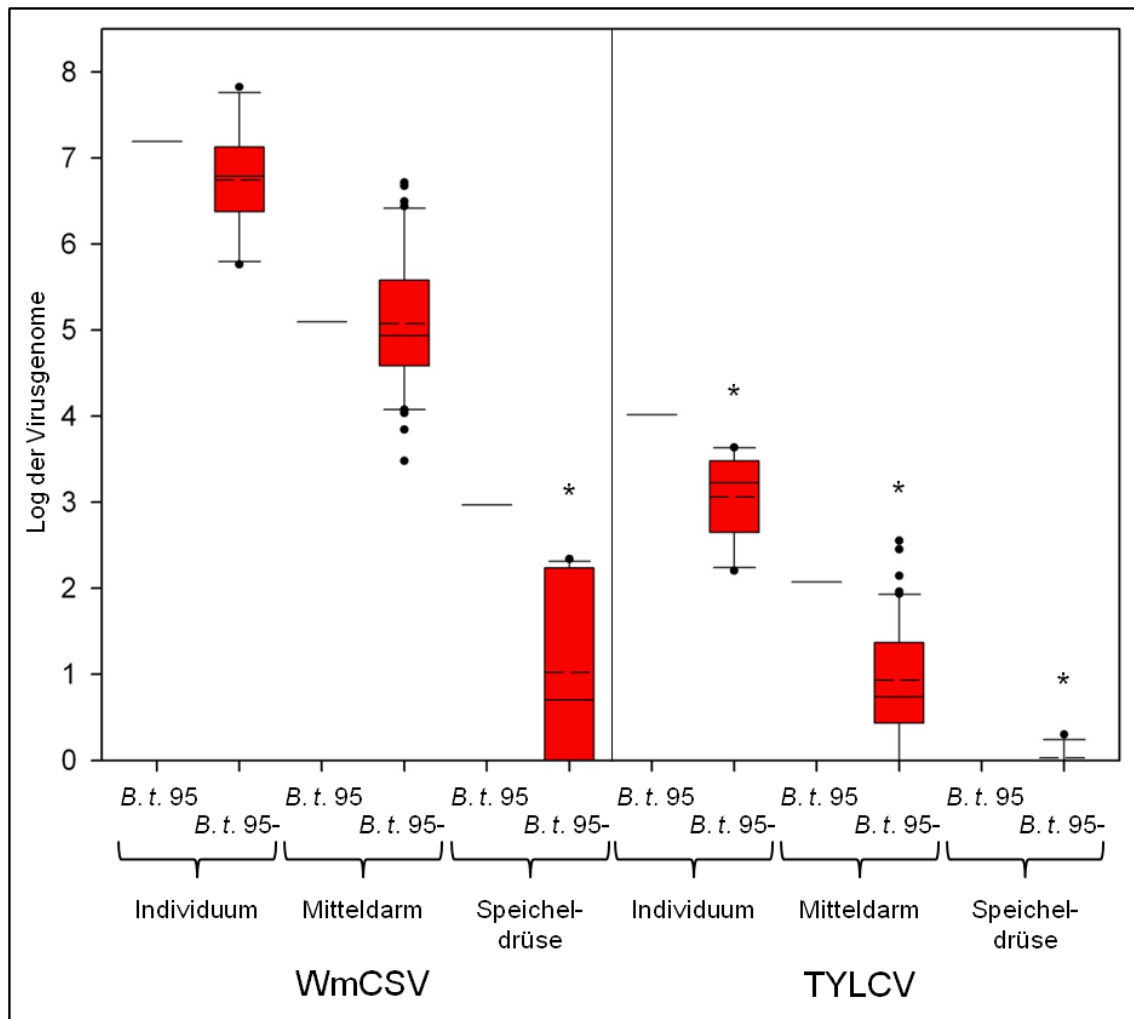
Die sekundären Endosymbionten *Hamiltonella* (♀/♂, 100%/100%), *Rickettsia* (♀/♂, 90%/67%) und *Wolbachia* (♀/♂, 100%/100%) waren in allen untersuchten einzelnen Männchen und Weibchen in ähnlichen Verhältnissen nachzuweisen, wie zuvor in den Population 63 und 95, was bestätigte, dass die unterschiedlichen Transmissionsraten nicht auf bestimmte Endosymbionten zurückzuführen sind. *Arsenophonus*, *Cardinium* und *Fritschea* konnten, wie erwartet, nicht in Populationen 95- nachgewiesen werden.

### 3.4.2 Absolute Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Individuen, Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen der *B. tabaci* Population 95-

Ebenso wie für die Population 63 und 95, wurde auch für die selektierte nicht virusübertragende Population 95- der Gehalt an WmCSV und TYLCV in ganzen Individuen, präparierten Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen quantifiziert (Abb. 3.16). Zum Vergleich wurden Individuen der Population 95 analysiert.

In ganzen Individuen und Mitteldärmen der Population 95- war der Gehalt an WmCSV ähnlich zu dem in Population 95, jedoch signifikant niedriger als die Viruskonzentrationen in der Population 63 aus Punkt 3.2.5 und 3.2.7. Daraus kann geschlossen werden, dass im Gegensatz zu TYLCV, die äußere Membran des Mitteldarms in Population 95- für WmCSV nur ein geringes Hindernis darstellt. Der WmCSV-Gehalt in primären Speicheldrüsen war hingegen in der nicht übertragenden Population 95- ( $6,9 \times 10^1$  Genome je Drüse) signifikant geringer, als der Gehalt in Speicheldrüsen von Population 95 ( $1,2 \times 10^3$ ). Neun der 18 Quantifizierungsreaktionen, mit jeweils 10 vereinigten Speicheldrüsen der Population 95-, verliefen negativ.

Die Konzentrationen der TYLCV-Genome sind in allen drei Populationen signifikant verschieden. Der Median der Quantifizierungsdaten für TYLCV ist, in ganzen Individuen von Population 95-, um einen Faktor von rund 2400 geringer, als der Median von Population 63 aus Punkt 3.2.5 (63/95-;  $4,1 \times 10^6/1,7 \times 10^3$  Genome pro Individuum). Der Unterschied zwischen den TYLCV-Konzentrationen in Mitteldärmen von Population 95 und 95- ist zwar gering, aber ebenfalls statistisch signifikant. In den primären Speicheldrüsen von virustragenden Individuen der Population 95 (s. auch Punkt 3.2.7) und 95- wurden TYLCV-Genome in nur sehr geringen Mengen bzw. selten gefunden. Lediglich in einer der 18 Reaktionen, mit je 10 vereinigten Speicheldrüsen der Population 95-, wurden TYLCV-Genome nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigen also, dass die äußere Membran des Mitteldarms in Population 95 und mehr noch in Population 95- eine sehr starke Barriere für TYLCV darstellt.



**Abbildung 3.16: Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in gesamten Individuen, Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen von *B. tabaci* Population 95- im Vergleich zu Population 95.** Die Boxplots für gesamte Individuen ergeben sich aus Daten, von zwei Wiederholungen mit je 10 Parallelen (biologische Repliken,  $n = 20$ ). Jede Parallele wurde in der qPCR einer Doppelbestimmung unterzogen (technische Parallele,  $N = 80$ ). Die Daten für Mitteldärme ergeben sich aus zwei Wiederholungen mit je 20 Parallelen ( $n = 40$ ,  $N = 160$ ). Für Speicheldrüsen aus drei Wiederholungen mit jeweils sechs Parallelen zu je 10 vereinten Drüsen ( $n = 18$ ,  $N = 72$ ). Die Boxen repräsentieren den Bereich in dem die mittleren 50 % der Daten liegen. Die Antennen definieren 95 % aller Daten. Die Punkte stellen Ausreißer dar. Die durchgehende horizontale Linie repräsentiert den Median, die gestrichelte Linie den Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte (s. Tab. 6.5). Die logarithmische y-Achseinteilung wurde vorgenommen, um eine übersichtliche Darstellung zu gewährleisten. Da je Wiederholung nur ein bis zwei Parallelen der Population 95 zur Kontrolle bzw. zum Vergleich mitbestimmt wurden, ließ sich aus den wenigen Daten keine Box erstellen. Daher sind nur die Mediane jeweils als Linie angegeben. \* Signifikanter Unterschied zwischen den Populationen.

### 3.4.3 Relative Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in der Hämolymphe von *B. tabaci* Population 95-

In gleicher Weise wie für die Population 63 und 95 (s. Punkt 3.2.8), wurden WmCSV und TYLCV in der Hämolymphe der Population 95- über einen Zeitraum von 6 Tagen

quantitativ bestimmt. Auch in Individuen dieser Population 95- ließen sich WmCSV und TYLCV in der Hämolymphe nachweisen. Nach Vergleich mit der Quantifizierung aus Punkt 3.2.8 lässt sich anhand der Mediane (Tab. 3.2) und Mittelwerte (Tab. 6.6) die Aussage treffen, dass im Durchschnitt der Gehalt beider Virusgenome in der Hämolymphe von Population 95-, trotz der großen Standardabweichungen, signifikant geringer war, als der Gehalt in der Population 63. In einzelnen Parallelen waren die Viren bereits nach 2 Stunden detektierbar, was einen Kontrast zu den Ergebnissen von Population 63 und 95 darstellt (WmCSV: 6 h; TYLCV: 4 h). Hier könnten jedoch saisonale Unterschiede die Ergebnisse verfälscht haben.

Hohe Standardabweichungen innerhalb der ersten 6 Stunden lassen auch erkennen, dass der Eintritt der Viren in die Hämolymphe nicht für alle Organismen zeitlich homolog erfolgte.

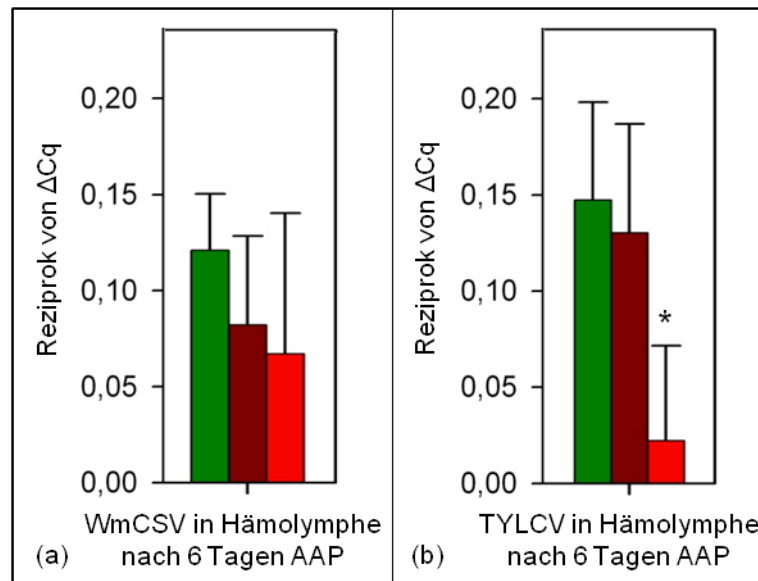
**Tabelle 3.2: Reziproke  $\Delta C_q$ -Mediane aus relativer Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus *B. tabaci* Hämolymphe über eine AAP von 6 Tagen.**

	Zeit	<i>B. tabaci</i> Population							
			63	95	95-		63	95	95-
Reziprok von $\Delta C_q$ -Median	0h	WmCSV	0,0000	0,0000	0,0000	TYLCV	0,0000	0,0000	0,0000
	2h		0,0000	0,0000	0,0000		0,1101	0,0000	0,0000
	4h		0,0000	0,0000	0,0000		0,1547	0,0731	0,0675
	6h		0,0739	0,0000	0,0000		0,1171	0,1014	0,0968
	8h		0,0708	0,0000	0,0000		0,1594	0,0793	0,0000
	24h		0,0694	0,0185	0,1048		0,1252	0,0000	0,0396
	30h		0,0904	0,0522	0,1105		0,1550	0,1011	0,0000
	6d		0,1215	0,0752	0,0532		0,1305	0,1079	0,0000

Die Mediane (Tab. 3.2) machen deutlich, dass nach 6 Stunden mehr als 50 % der Individuen von Population 63 detektierbare Mengen an WmCSV aufgenommen hatten, während dies bei Population 95 und 95- erst nach 24 Stunden der Fall war. Der WmCSV-Gehalt im Median und Mittelwert blieben nach diesem Zeitpunkt auch für die Population 95- relativ hoch (Abb. 3.17), ein Hinweis darauf, dass der Mitteldarm keine bedeutende Barriere für WmCSV darstellte.

Der Tabelle 3.2 ist zu entnehmen, dass der relative Gehalt an TYLCV in der Hämolymphe der Population 95- durchgehend sehr gering war. Die sehr niedrigen Werte bei Population 95- sind ein Hinweis auf eine starke Barriere-Wirkung des Mitteldarms dieser Population für TYLCV.





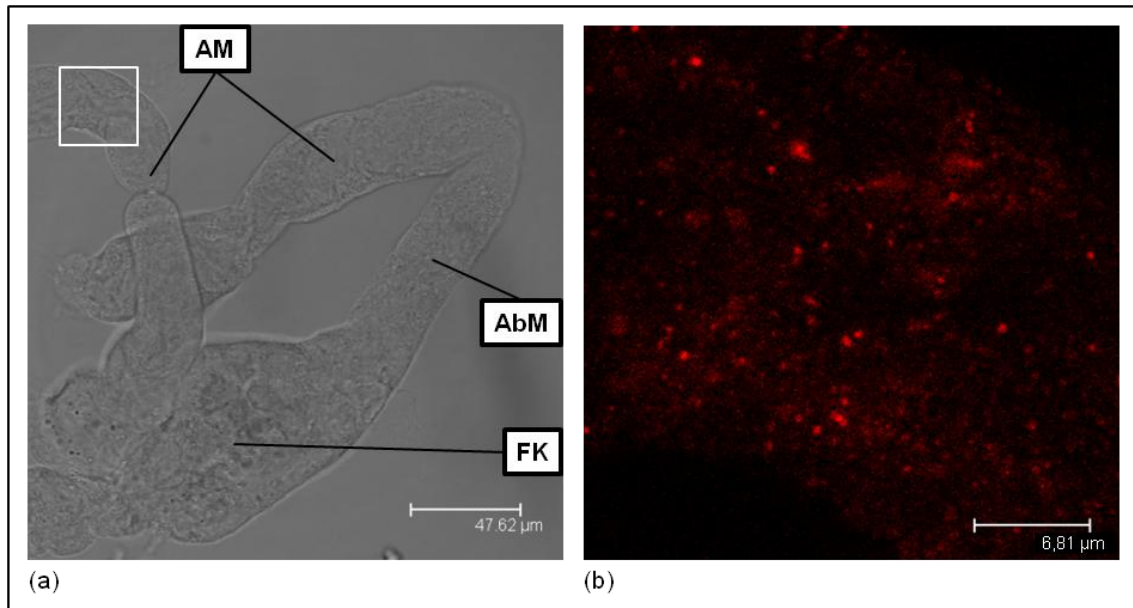
**Abbildung 3.17: Relative Quantifizierung von WmCSV (a) und TYLCV (b) aus Hämolymphe von *B. tabaci* 63 (grün), 95 (braun) und 95- (rot).** Virusfreie fünf Tage alte Weiße Fliegen wurden auf symptomatische Wirtspflanzen übergesetzt. Nach sechs Tagen wurden sechs Mal aus fünf Individuen die Hämolymphe extrahiert und vereinigt (n = 6, N = 36). Die Begomoviren wurden relativ quantifiziert, mit der 18S DNA von *B. tabaci* als Referenzgen. Diagramme basieren auf Mittelwerten mit jeweiliger Standardabweichung. \* Signifikanter Unterschied zwischen den Populationen.

#### 3.4.4 Lokalisierung von WmCSV und TYLCV in Population 95-

In den Mitteldärmen der Population 95- ließ sich, DNA von WmCSV in den Filterkammern, den absteigenden Mitteldärmen und den Blinddärmen mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nachweisen (Abb. 3.18). Das Signal der Sonde war, wie zuvor in Population 95 oftmals schwächer ausgeprägt als in Mitteldärmen der Population 63. TYLCV war aufgrund der geringen Molekülzahlen, mittels FISH in Mitteldärmen der Population 95-, nicht nachzuweisen.

Eine FISH zum Nachweis von WmCSV und TYLCV in den Speicheldrüsen der Population 95- wurde nicht durchgeführt, da aufgrund der geringen Viruskonzentrationen, die mittels qPCR quantifiziert wurden, eine Detektion dieser Begomoviren mittels Sonden als unwahrscheinlich eingeschätzt wurde.





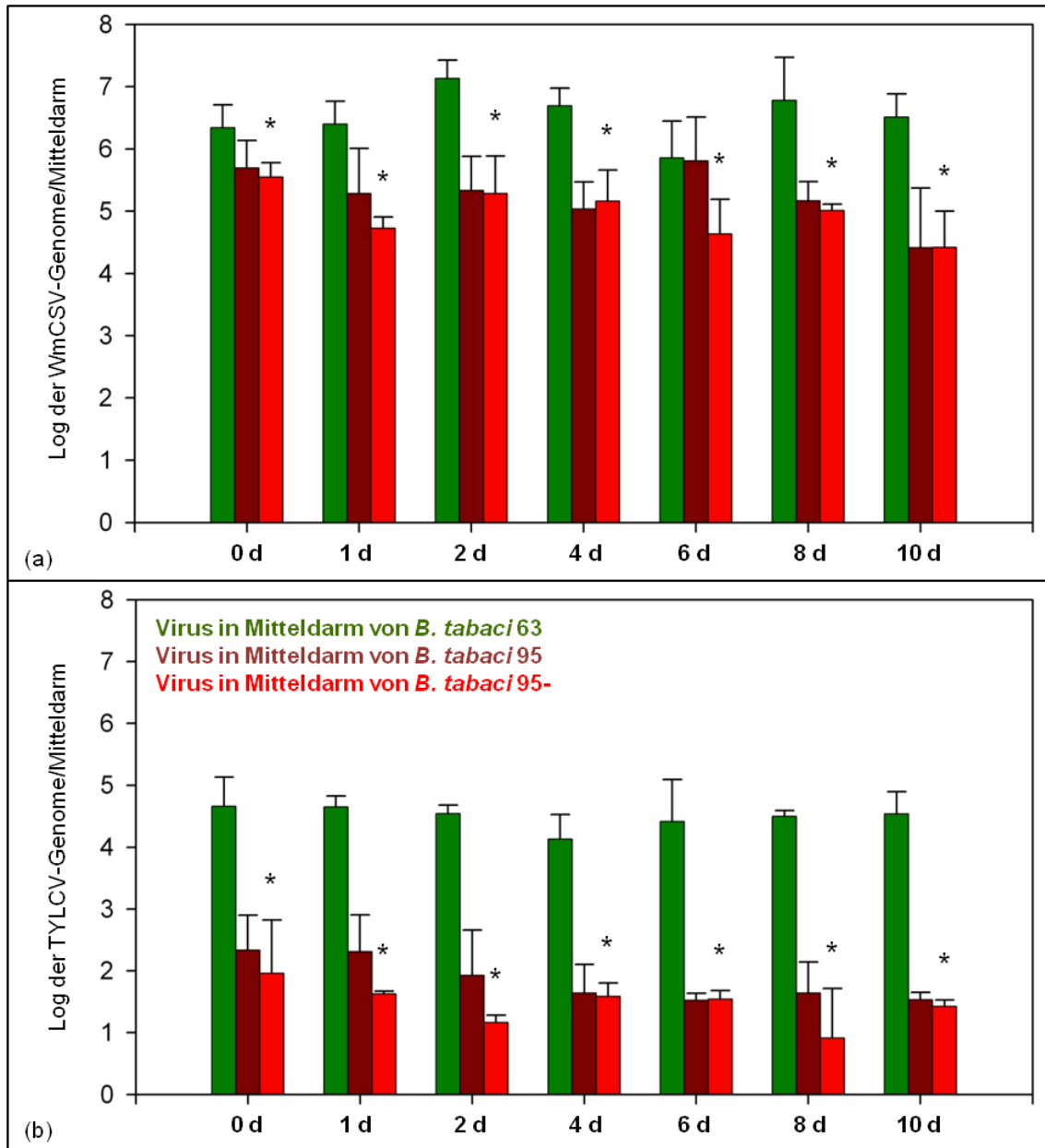
**Abbildung 3.18: Lokalisierung von WmCSV in einem Mitteldarm eines Weibchens der *B. tabaci* Populationen 95- durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.** (a) Mitteldarm im Hellfeld. AbM absteigender Mitteldarm, AM aufsteigender Mitteldarm, FK Filterkammer. (b) Ausschnitt aus (a) als Fluoreszenzscan zum Nachweis der Cy3 markierten Sonde, nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm), mit Signal im aufsteigenden Mitteldarm.

### 3.5 Viruskonzentration in Mitteldärmen und Hämolymphe nach Übertragen virustragender *B. tabaci* von infizierten Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen

Nachdem WmCSV und TYLCV in Insekten, sowie in präparierten Organen aller drei *B. tabaci* Populationen 63, 95 und 95- quantifiziert und lokalisiert waren, wurde vermutet, dass nach Austausch einer virusinfizierten symptomatischen Wirtspflanze durch eine Nicht-Wirtspflanze die Viruskonzentrationen in den Individuen der verschiedenen Populationen innerhalb weniger Tage unterschiedlich stark zurück gehen. Um dies zu prüfen, wurden Individuen der Population 63, 95 und 95- für 4 Tage auf infizierten Wirtspflanzen gehalten und anschließend auf Nicht-Wirtspflanzen überführt. Über einen Zeitraum von 10 Tagen, wurde zu 7 Zeitpunkten der Virusgehalt in den Mitteldärmen ermittelt (Abb. 3.19).

Die Quantifizierung der absoluten Viruskonzentration pro Mitteldarm der jeweiligen *B. tabaci* Population lässt erkennen, dass der WmCSV-Gehalt, über den gesamten Zeitraum von 10 Tagen höher war als der Gehalt an TYLCV. Der Gehalt beider Viren war in Population 95- stets signifikant geringer als in Population 63, jedoch war eine starke Abnahme der Virusgehalte weder bei WmCSV noch bei TYLCV festzustellen. Bei den Populationen 95 und 95- war für TYLCV in den ersten zwei Tagen ein geringer Abfall der Konzentration zu verzeichnen. Die Konzentration verbleibt ab dem zweiten

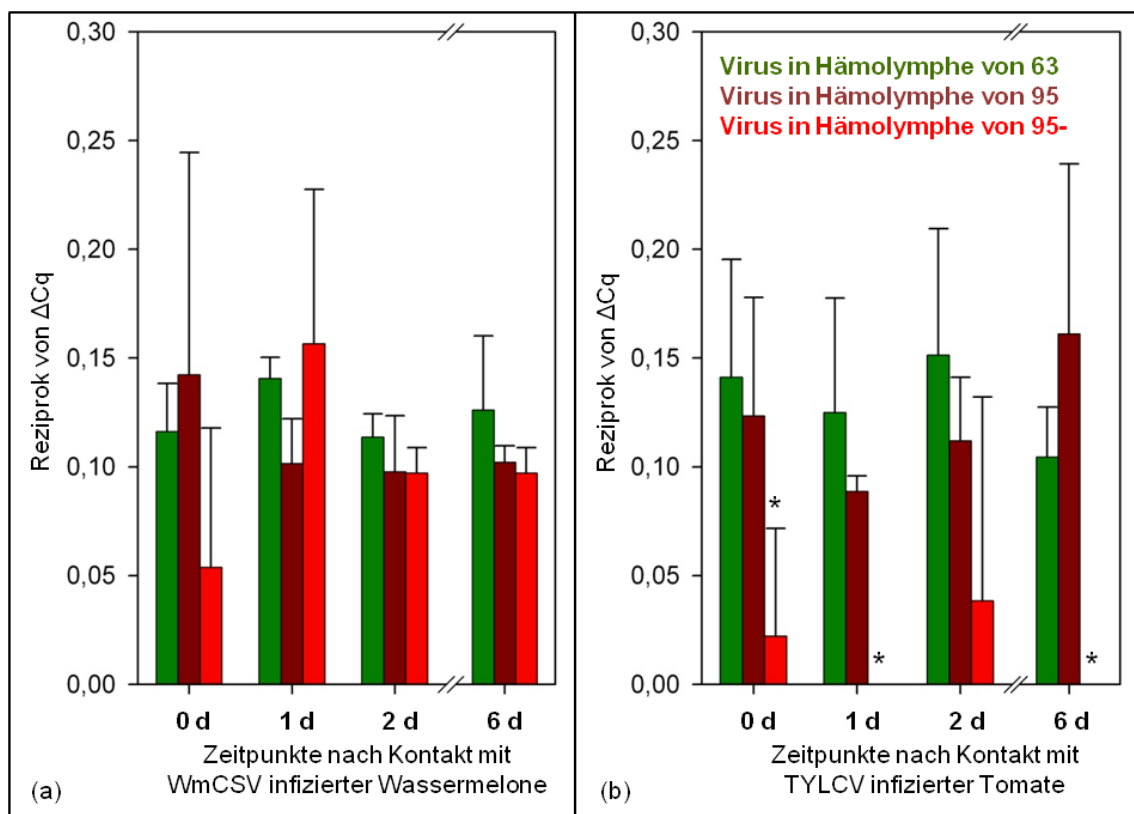
Tag auf einem ähnlichen Niveau bis zu Tag 10. Dies beweist, dass eine nahezu vollständige Dekontamination des Darmlumens in den ersten zwei Tagen stattfand. Damit konnte bewiesen werden, dass der Gehalt an WmCSV und TYLCV im Mitteldarm von allen drei Populationen *B. tabaci* über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Entzug der infizierten Wirtspflanze relativ konstant bleibt.



**Abbildung 3.19: Absoluter Virusgehalt in Mitteldärmen von *B. tabaci* Population 63, 95 und 95-, nachdem die Insekten von infizierten symptomatischen Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen überführt wurden.** Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 10 Tage (d). Die Virusgenommengen sind als logarithmische Zahlen dargestellt und stellen den Virusgehalt je durchschnittlichen Mitteldarm wieder ( $n = 9$ ,  $N = 378$ ). Mittelwerte und Standardabweichungen s. Tab. 6.7. (a) Durchschnittlicher WmCSV-Gehalt pro Mitteldarm. (b) Durchschnittlicher TYLCV-Gehalt pro Mitteldarm. \* Signifikanter Unterschied zwischen Population 63 und 95-.

Durch relative Quantifizierung wurde, in geringerem Umfang (vier Zeitpunkte), auch der Virusgehalt in der Hämolymphe untersucht, nachdem die Insekten von den infizierten Wirtspflanzen isoliert wurden (Abb. 3.20, Tab. 6.8). Auch hier war trotz hoher Standardabweichung zu erkennen, dass die Viruskonzentration über einen längeren Zeitraum jeweils relativ konstant blieb. Der Gehalt beider Viren lag in Population 63 im Durchschnitt über den Werten der anderen Populationen. In der Hämolymphe der Population 95- waren TYLCV-Genome zu Beginn (0 d), sowie über den gesamten folgenden untersuchten Zeitraum, in dem eine Dekontamination des Darmlumens stattfand (1 d – 6 d), nur in Spuren nachzuweisen. Dies steht im Einklang mit der Quantifizierung zur Virusaufnahme in die Hämolymphe (Punkt 3.2.8) und belegt, dass TYLCV die Darmbarriere in dieser Population kaum zu überwinden vermag.

WmCSV war auch 6 Tage nach Transfer auf Nicht-Wirtspflanzen in der Hämolymphe der Population 95- gut nachweisbar, was die Annahme stützt, dass die Speicheldrüsen die Barriere für dieses Virus sind. Darüber hinaus belegen die Beobachtungen, dass in der Hämolymphe kein, für die Übertragung relevanter, Abbau von WmCSV stattfindet.



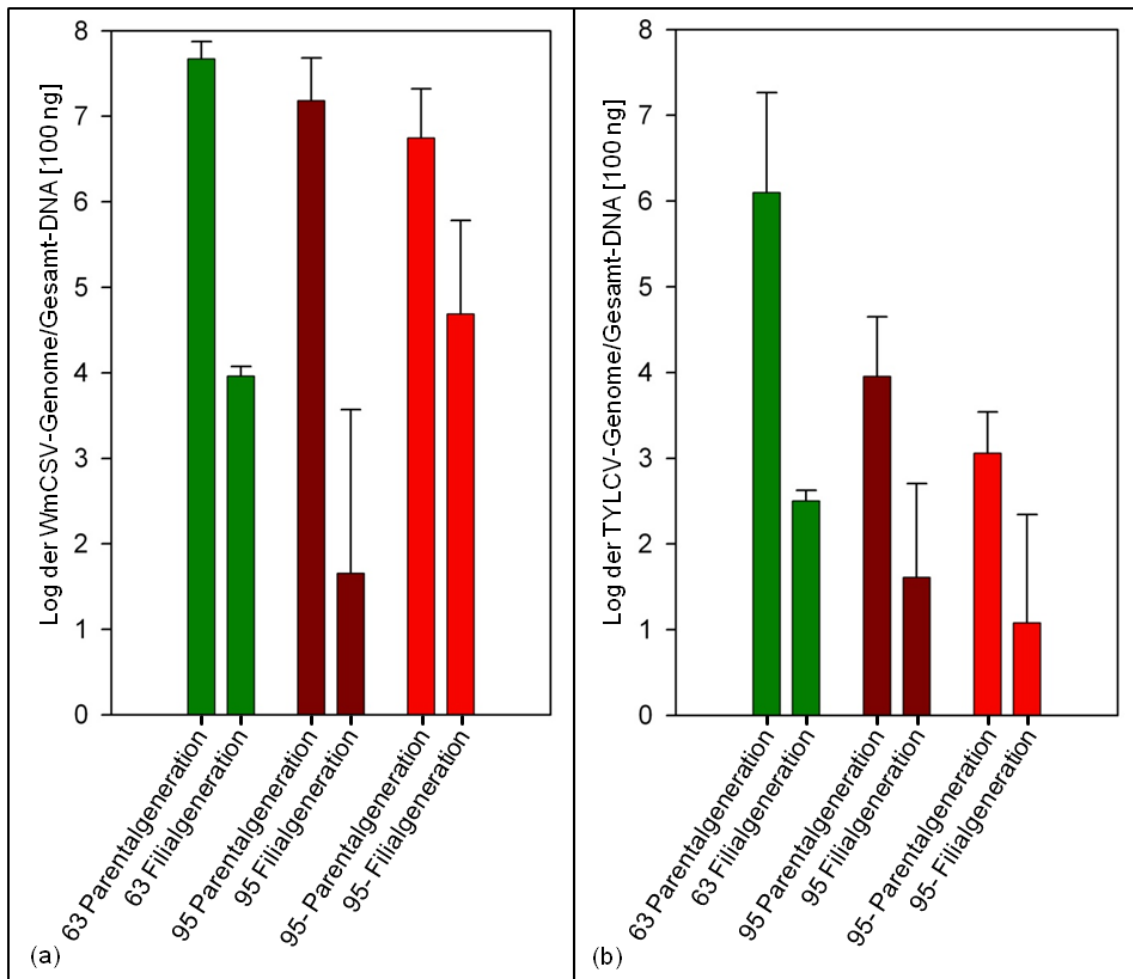
**Abbildung 3.20: Relativer Virusgehalt in Hämolymphe von *B. tabaci* Population 63, 95 und 95-, nachdem die Insekten von infizierten symptomatischen Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen überführt wurden.**  $\Delta C_q$ -Werte sind als Reziprok dargestellt, um einen höheren Virusgehalt durch einen höheren Wert anzeigen zu können ( $n = 3$ ,  $N = 72$ ). (a) relativer WmCSV-Gehalt in der Hämolymphe. (b) TYLCV-Gehalt in der Hämolymphe. \* Signifikanter Unterschied zwischen Population 63 und 95-.

### 3.6 Virusgehalt in Nachkommen der virustragenden Weiße Fliegen

Neben der Frage, wie sich die durch *B. tabaci* aufgenommenen Virusmengen quantitativ nach Entzug der Wirtspflanze verhalten, wurde der Frage nachgegangen, ob die Viren transovarial an die nachkommende Generation weitergegeben werden. Zusätzlich wurde untersucht, ob diese Nachkommen Wirtspflanzen infizieren können. Dazu wurden Individuen der Elterngeneration 5 Tage auf virusinfizierten symptomatischen Wirtspflanzen gehalten und anschließend für 2 Tage dekontaminiert. Danach wurden die Pflanzen ausgetauscht, um eine Kontamination mit Viren des ausgeschiedenen Honigtaus zu verringern. Auf den neuen Nicht-Wirtspflanzen verbleiben die Insekten 6 Tage zur Eiablage. Die aus den Eiern entwickelten adulten Tiere wurden mittels qPCR auf ihren Virusgehalt untersucht, sowie auf junge Wirtspflanzen überführt, um ihre Transmissionsfähigkeit zu überprüfen.

Abbildung 3.21 zeigt die über qPCR ermittelten Virusmengen in Elterngenerationen und ihren direkten Folgegenerationen. Einen signifikanten Unterschied im Virusgehalt zwischen den Nachkommen, die sofort untersucht wurden und jenen, die zur Eiablage und Kontakt mit jungen Wirtspflanzen fünf Tage lebten, wurde nicht festgestellt. Die Daten sind daher zusammengefasst. Es wurde festgestellt, dass in den Nachkommen aller drei Populationen Virusgenome detektierbar sind. Je höher der Virusgehalt in den jeweiligen Elterngenerationen war, desto geringer war der prozentuale Anteil in den Nachkommen (Tab. 3.3).

Auffällig ist, dass in den Nachkommen der nicht übertragenden Population 95- besonders viele WmCSV-Genome nachzuweisen waren. In Nachkommen der gleichen Population konnten in geringen Mengen auch TYLCV-Genome detektiert werden ( $8,4 \times 10^2$ ). Es wird daraus geschlossen, dass die wenigen TYLCV-Partikel, die in die Hämolymphe der Population 95- eindringen, ebenfalls an die Nachkommen weitergegeben werden können.



**Abbildung 3.21: Virusgehalt in gesamten Individuen von Eltern- und Nachfolgegeneration der *B. tabaci* Populationen 63 (grün), 95 (braun) und 95- (rot).** (a) Logarithmus des WmCSV-Gehalts in Individuen mit durchschnittlich jeweils 100 ng an Gesamt-DNA. (b) Logarithmus des TYLCV-Gehalts in Individuen mit durchschnittlich jeweils 100 ng an Gesamt-DNA.

Die jungen Wirtspflanzen, auf denen je Population und Virus ca. 200 Nachkommen für 5 Tage inkubiert wurden, blieben über einen Beobachtungszeitraum von 4 Wochen allesamt symptomlos. In 25 % der Wassermelonen, die mit Nachkommen der Population 63 besetzt waren, ließ sich mittels PCR WmCSV-DNA nachweisen. Ebenso konnte in 50 % aller Tomaten TYLCV nachgewiesen werden. Da alle Nachweise von Virus-DNA mittels qPCR nicht mit einer Infektion von Pflanzen zu korrelieren war, sind diese Befunde nur mit einem möglichen Virusnachweis in auf den Blättern abgelegten *B. tabaci* Eiern zu erklären.

**Tabelle 3.3: Mittelwerte der Virusgenommengen in virustragenden Individuen und deren Nachkommen die ausschließlich Kontakt zu virusfreien Nicht-Wirtspflanzen hatten.** Angegeben sind die Werte je 100 ng DNA, ebenfalls die Standardabweichungen (St.), sowie die Mittelwerte der logarithmierten Einzelwerte (G. Log) und deren Standardabweichungen (St. Log.). In der rechten Spalte ist das prozentuale Verhältnis zwischen den quantifizierten Virusgenomen in parentalen Individuen und Nachkommen angegeben.

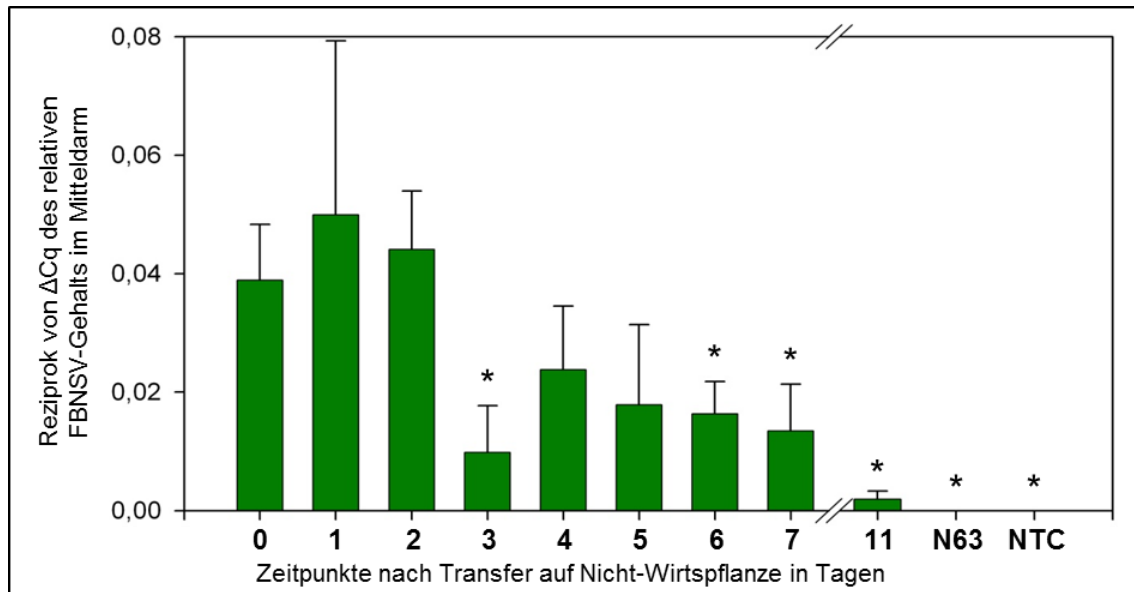
	Pop.	Virusgenome Eltern				Virusgenome Nachkommen				Prozentuales Verhältnis
WmCSV	63	Genome	5,164x10 <sup>7</sup>	St.	2,189x10 <sup>7</sup>	Genome	9,377x10 <sup>3</sup>	St.	2,415x10 <sup>3</sup>	0,018 %
	95		3,149x10 <sup>7</sup>		5,317x10 <sup>7</sup>		1,031x10 <sup>3</sup>		1,203x10 <sup>3</sup>	0,003 %
	95-		1,230x10 <sup>7</sup>		1,972x10 <sup>7</sup>		2,131x10 <sup>5</sup>		2,642x10 <sup>5</sup>	1,732 %
	63	G. Log.	7,671	St. Log.	0,204	G. Log.	3,961	St. Log.	0,114	
	95		7,183		0,499		1,656		1,913	
	95-		6,746		0,578		4,686		1,095	
TYLCV	63	Genome	5,074x10 <sup>6</sup>	St.	5,954x10 <sup>6</sup>	Genome	3,270x10 <sup>2</sup>	St.	8,597x10 <sup>1</sup>	0,006 %
	95		2,233x10 <sup>4</sup>		2,959x10 <sup>4</sup>		1,193x10 <sup>2</sup>		1,159x10 <sup>2</sup>	0,633 %
	95-		1,784x10 <sup>3</sup>		1,491x10 <sup>3</sup>		8,350x10 <sup>1</sup>		1,174x10 <sup>2</sup>	4,681 %
	63	G. Log.	6,099	St. Log.	1,168	G. Log.	2,502	St. Log.	0,122	
	95		3,955		0,695		1,609		1,094	
	95-		3,059		0,482		1,081		1,263	

### 3.7 Barrieren für ein nicht durch Weiße Fliegen übertragbares Virus

Nachdem die äußere Membran des Mitteldarms der Population 95- als starke Barriere für TYLCV und die Speicheldrüsen als bedeutende Barriere für WmCSV ausgemacht waren, wurde untersucht, welche Barrieren für ein nicht durch *B. tabaci* übertragbares Virus in Individuen der Population 63 bestehen, bzw. ob Gemeinsamkeiten mit den Beobachtungen für Population 95 und 95- festzustellen sind. Dazu wurden Individuen der Population 63 auf FBNSV infizierte symptomatische Erbsen überführt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden Mitteldärme und Hämolymphe der Individuen präpariert und die Viren mittels relativer qPCR quantifiziert.

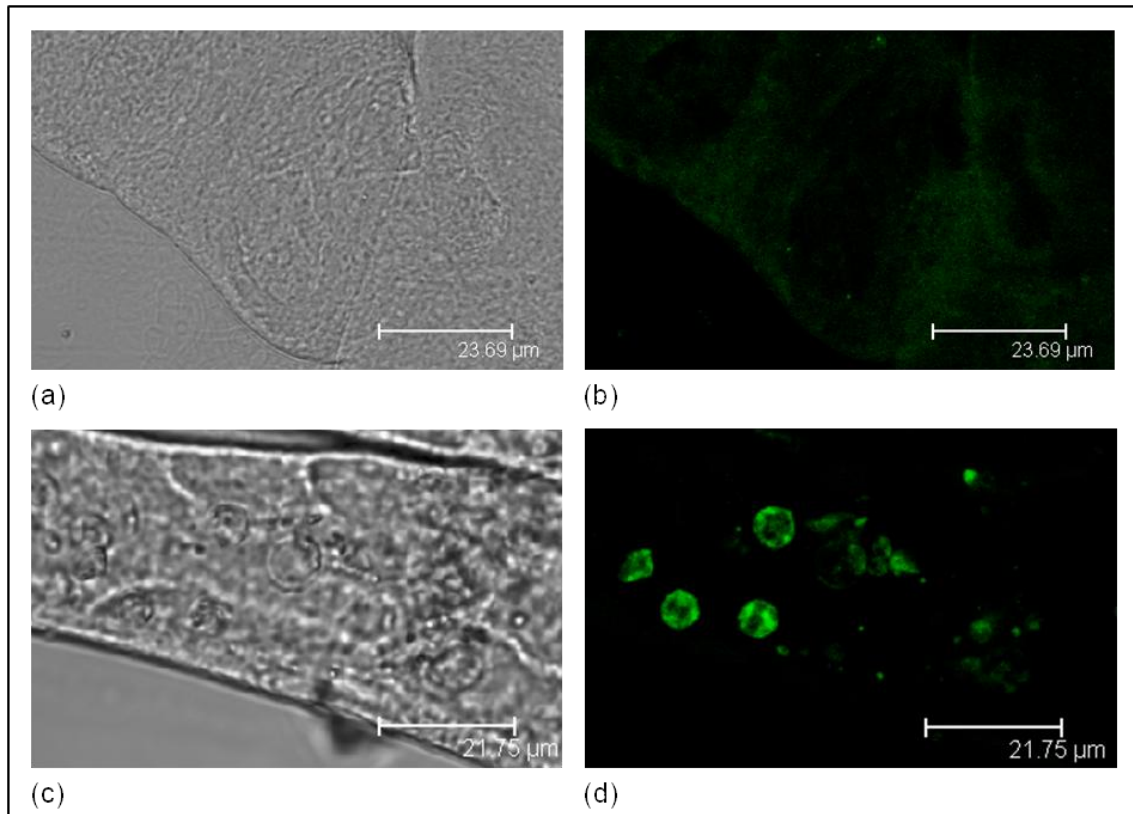
Über die gesamte Laufzeit des Versuchs (11 Tage) waren Virusgenome in den Mitteldärmen nachweisbar (Abb. 3.22). Ab dem dritten Tag nach Übersetzen der Insekten auf die Nicht-Wirtspflanzen war eine Abnahme der Viruskonzentration in Mitteldärmen zu verzeichnen, welche auf die Dekontamination des Darmlumens zurückgeführt wird. Dennoch waren auch im Folgenden noch relativ viele Viren in den Mitteldärmen nachweisbar.

In der Hämolymphe wurde zu keinem der neun Zeitpunkte FBNSV nachgewiesen. Somit wird die Aussage getroffen, dass der Mitteldarm die Barriere für dieses Nanovirus darstellt.



**Abbildung 3.22: Relativer FBNSV-Gehalt in Mitteldärmen von Individuen der *B. tabaci* Population 63 nach 5-tägigen Kontakt mit infizierten Wirtspflanzen und anschließenden Transfer auf Nicht-Wirtspflanzen für 11 Tage.** Der relative Virusgehalt ist als Reziprok der  $\Delta Cq$ -Mittelwerte dargestellt ( $n = 3$ ,  $N = 27$ ), N63 Gehalt in Mitteldärmen von virusfreien Individuen der Population 63. NTC *non template control* (Negativ-Kontrolle) der qPCR. \* Signifikanter Unterschied zum Zeitpunkt 0.

Des Weiteren wurden Mitteldärme von FBNSV tragenden und virusfreien Weiße Fliegen der Population 63 am konfokalen Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Abb. 3.23). Innerhalb der Mitteldarmzellen waren deutlich vesikuläre Strukturen zu erkennen, die nach Untersuchung mit dem Argon-Laser (488 nm), durch ein detektierbares Lichtsignal hervortraten. Diese Strukturen, die ca. 6  $\mu m$  im Durchmesser betrugen, wurden weder in Mitteldärmen von Weiße Fliegen, die auf virusfreien Erbsen gehalten wurden, gefunden, noch in Mitteldärmen von WmCSV und TYLCV tragenden Weiße Fliegen. Eine Untersuchung durch einen  $\lambda$ -Scan enthüllte, dass es sich bei dem aufgefangenen Signal um eine starke Autofluoreszenz bzw. Laserreflexion von Molekülen handelt, die sich vor allem in oder auf den Membranen der runden Strukturen befinden. Eine Identifizierung der großen vesikulären Strukturen, beispielsweise mittels Lysosom-Farbstoffe, wurde nicht durchgeführt, da die vesikulären Strukturen in WmCSV und TYLCV tragenden Mitteldärmen nicht auftraten. Ihr Vorhandensein ist aber ein wichtiges Indiz für eine spezifische Reaktion der Darmzellen auf die Anwesenheit von FBNSV und somit ein Hinweis darauf, dass diese Viren entweder in die Zellen des Mitteldarms eindringen können oder an der äußeren Membran anhaften und dadurch Prozesse induzieren, die zur Vesikelbildung führen. Da in der qPCR ausschließlich Viren in Mitteldärmen nachgewiesen wurden und keine Viren in der Hämolymphe, wird geschlussfolgert, dass die äußere Membran oder die Zellen des Mitteldarms eine unüberwindbare Barriere für das FBNSV darstellen.



**Abbildung 3.23: Mitteldärme von *B. tabaci* Population 63, welche fünf Tage auf gesunden Erbsen bzw. auf FBNSV infizierten Erbsen inkubiert wurden.** (a) Durchlichtbild eines Ausschnitts eines absteigenden Mitteldarms einer Weiße Fliege, die auf einer gesunden Erbse inkubiert wurde. (b) Fluoreszenzscan von (a) nach Anregung mit Argon-Laser (488 nm). Nur geringe Autofluoreszenz feststellbar. (c) Durchlichtbild eines Ausschnitts eines absteigenden Mitteldarms einer Weiße Fliege, die auf einer FBNSV infizierten symptomatischen Erbse inkubiert wurde. (d) Fluoreszenzscan von (c) nach Anregung mit Argon/Krypton-Laser (488 nm). Stark fluoreszierende vesikuläre Strukturen in den Darmzellen.

### 3.8 Protein-Virus-Interaktionen

Parallel zur Selektion einer nicht übertragenden Subpopulation aus der schwach übertragenden Population 95, wurde die Interaktion der Begomoviren mit dem Hitzeschockprotein Hsp70 der Weiße Fliegen untersucht. Im Rahmen eines GIF-Projekts, mit dem Titel „*Identification of genes involved in circular transmission of begomoviruses in whiteflies*“, wurde *in vitro* eine Interaktion zwischen den Hüllproteinen von WmCSV und TYLCV und dem Hsp70 von *B. tabaci* nachgewiesen (Götz *et al.*, 2012). In dieser Arbeit sollte die Vermutung ausgeschlossen werden, dass Unterschiede in der Interaktion zwischen den Hüllproteinen der Viren und Hsp70 der Population 63 und 95, die Ursache für die unterschiedliche Übertragung darstellen.

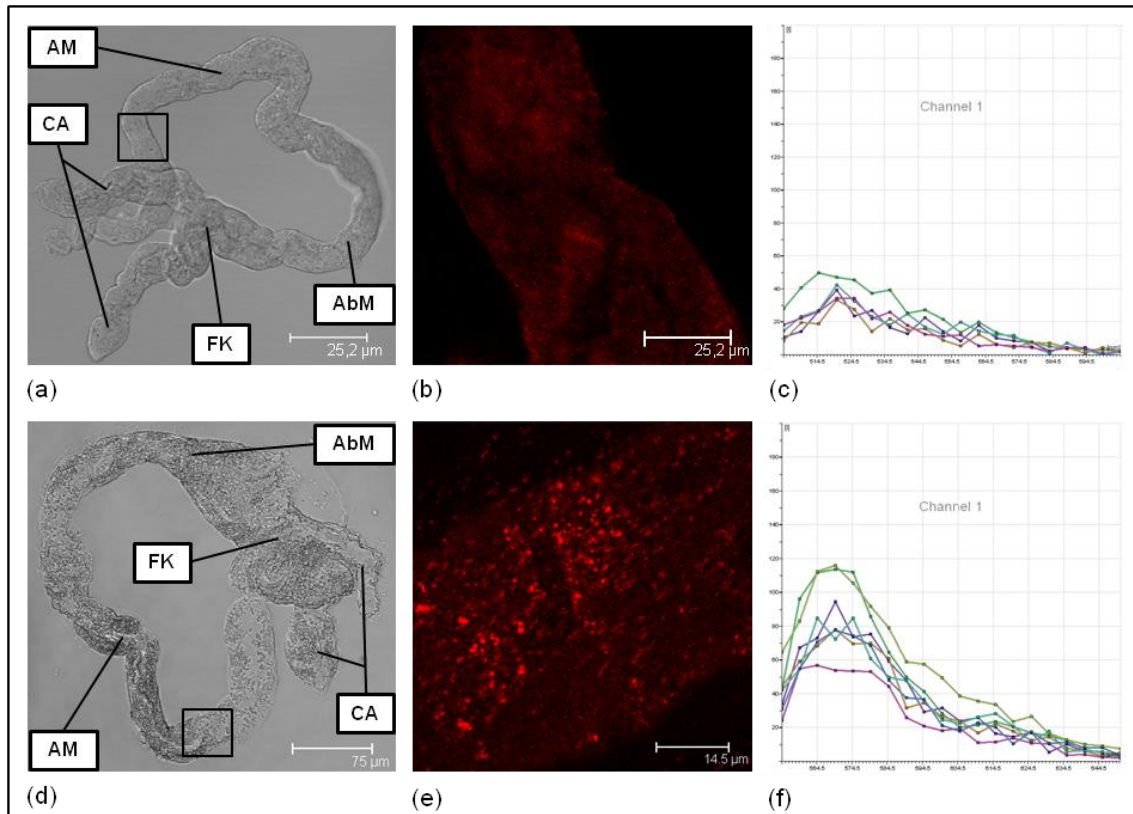


### 3.8.1 Ko-Immunolokalisierung von WmCSV bzw. TYLCV mit Hsp70

Die Ko-Lokalisierungsstudien wurden in Mitteldärmen durchgeführt. Dazu wurden virustragende Individuen der Population 63 und 95 für zwei Tage dekontaminiert, die Mitteldärme präpariert und anschließend mit Antikörper gegen Hsp70 und gegen TYLCV bzw. WmCSV behandelt. Die Antikörper wurden dann wiederum mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern am konfokalen Fluoreszenzmikroskop detektiert.

#### Immunolokalisierung von Hsp70

Abbildung 3.24 zeigt zwei Mitteldärme von Individuen der Population 63. Ein Mitteldarm wurde einem Insekt entnommen, das ausschließlich auf virusfreien Wirtspflanzen lebte. Das andere Insekt wurde vor der Präparation des Mitteldarms fünf Tage auf WmCSV infizierten symptomatischen Wassermelonen gehalten. Anschließend wurde das Darmlumen zwei Tage auf Nicht-Wirtspflanzen dekontaminiert. Zwischen beiden Mitteldärmen war ein deutlicher Unterschied in der Stärke des Fluoreszenzsignals der sekundären Antikörper gegen den anti-Hsp70 Antikörper festzustellen. Während in Mitteldärmen von virusfreien Insekten lediglich ein schwaches Fluoreszenzsignal zu verzeichnen war, war in Mitteldärmen von WmCSV-tragenden Insekten die *hsp70* Expression stark erhöht. Lambda-Fluoreszenzscans belegten ebenfalls die unterschiedliche Signalstärke und zusätzlich die korrekte Zuordnung des Signals zu dem Fluorophor (Cy3) der sekundären Antikörper. Das Signal in virustragenden Mitteldärmen trat immer in einer Vielzahl kleiner Spots auf, die über den gesamten Mitteldarm relativ gleichmäßig im Zytoplasma der Darmzellen verteilt waren. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Population 95, sowie bei TYLCV-tragenden Insekten der Population 63 (Daten nicht gezeigt). Somit ist, durch die Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop, ein direkter Zusammenhang zwischen Virusaufnahme und Erhöhung des Expressionslevels von Hsp70 ersichtlich.

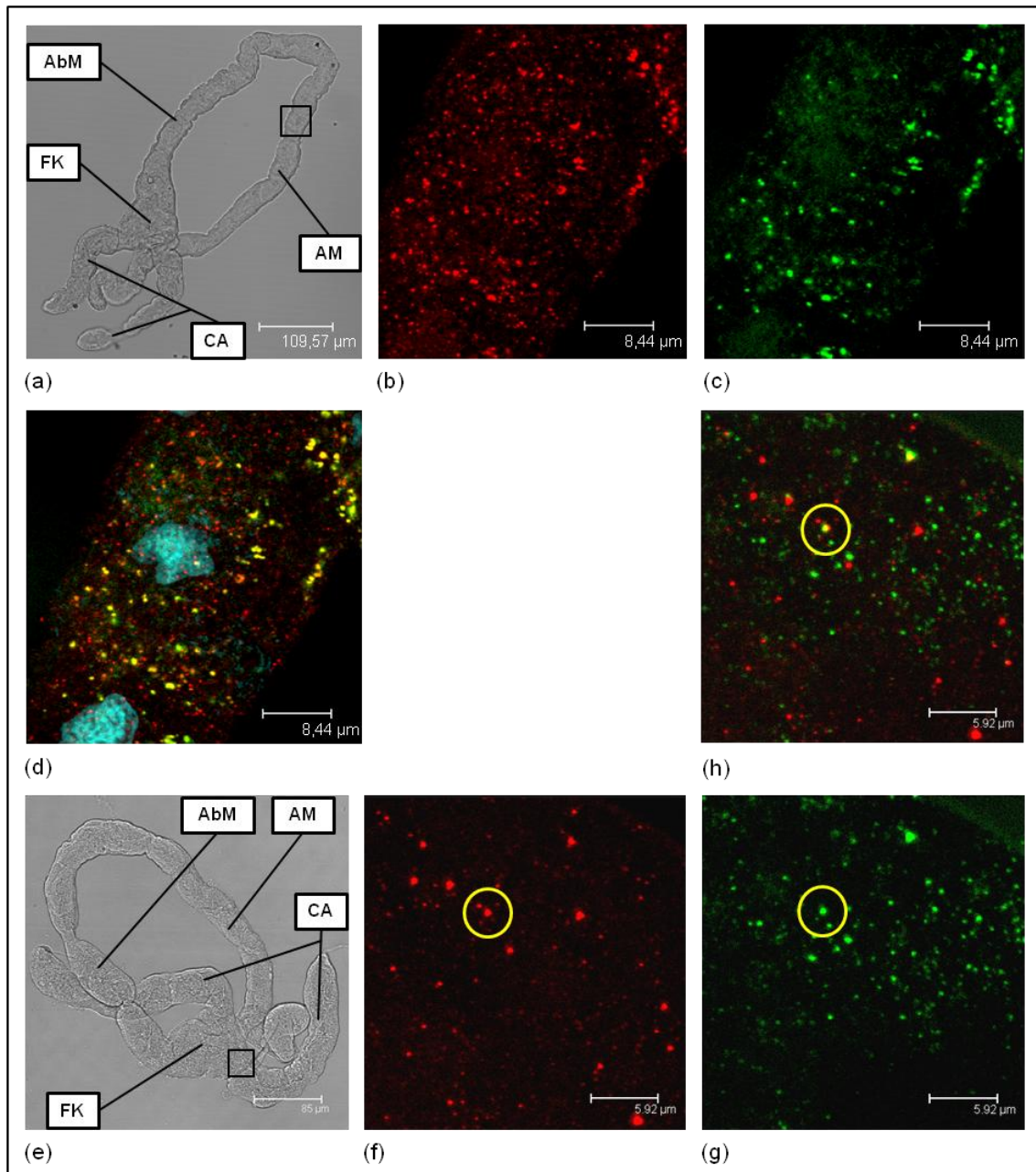


**Abbildung 3.24: Nachweis von Hsp70 in Mitteldärmen von virusfreien und WmCSV-tragenden *B. tabaci*.** (a) Mitteldarm eines virusfreien Individuums von Population 63 im Durchlicht. (b) Fluoreszenzscan eines Ausschnitts von (a) im Bereich von ca. 560 bis ca. 600 nm Wellenlänge des Lichts, mit schwachem Cy3-Signal des sekundären Antikörpers, nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm). (c)  $\lambda$ -Scan zu (b) im Bereich von 555 bis 655 nm mit einem schwachen Maximum bei ca. 570 nm. (d) Mitteldarm eines WmCSV-tragenden Individuums der Population 63. (e) Fluoreszenzscan eines Ausschnitts von (d) im Bereich von ca. 560 bis ca. 600 nm Wellenlänge des Lichts, mit starkem Cy3-Signal im Zytoplasma. (f)  $\lambda$ -Scan zu (e) im Bereich von 555 bis 650 nm mit einem Maximum bei ca. 570 nm. AbM absteigender Mitteldarm, AM aufsteigender Mitteldarm, CA caeca (Blinddarm), FK Filterkammer.

#### Ko-Immunolokalisierung von WmCSV und Hsp70

Abbildung 3.25 (a) – (d) zeigt eine Ko-Immunolokalisierung von WmCSV und Hsp70 im Mitteldarm einer Weiße Fliege der Population 63. WmCSV wurde mit einem Antikörperpaar nachgewiesen, dessen sekundärer Antikörper mit FITC (grün) markiert war. Hsp70 wurde mittels Cy3 (rot) markierten Antikörpern detektiert. Virus- und Hsp70-Detektion gaben starke Signale in unterschiedlich großen Spots. Eine Überlagerung von Fluoreszenzscans desselben Darmabschnitts enthüllte, dass es gemeinsame Anlagerung von beiden Antikörperpaaren gab. In 37,5 Prozent (15 von 40) der untersuchten Mitteldärme war eine Ko-Lokalisierung von WmCSV und Hsp70 zu finden. In diesen Mitteldärmen traten immer auch Spots für Hsp70 und WmCSV auf,

die nicht ko-lokalisiert waren. Durch DAPI-Färbung (türkisfarben) ließ sich zeigen, dass weder Hsp70 noch WmCSV in Zellkernen vorkamen.

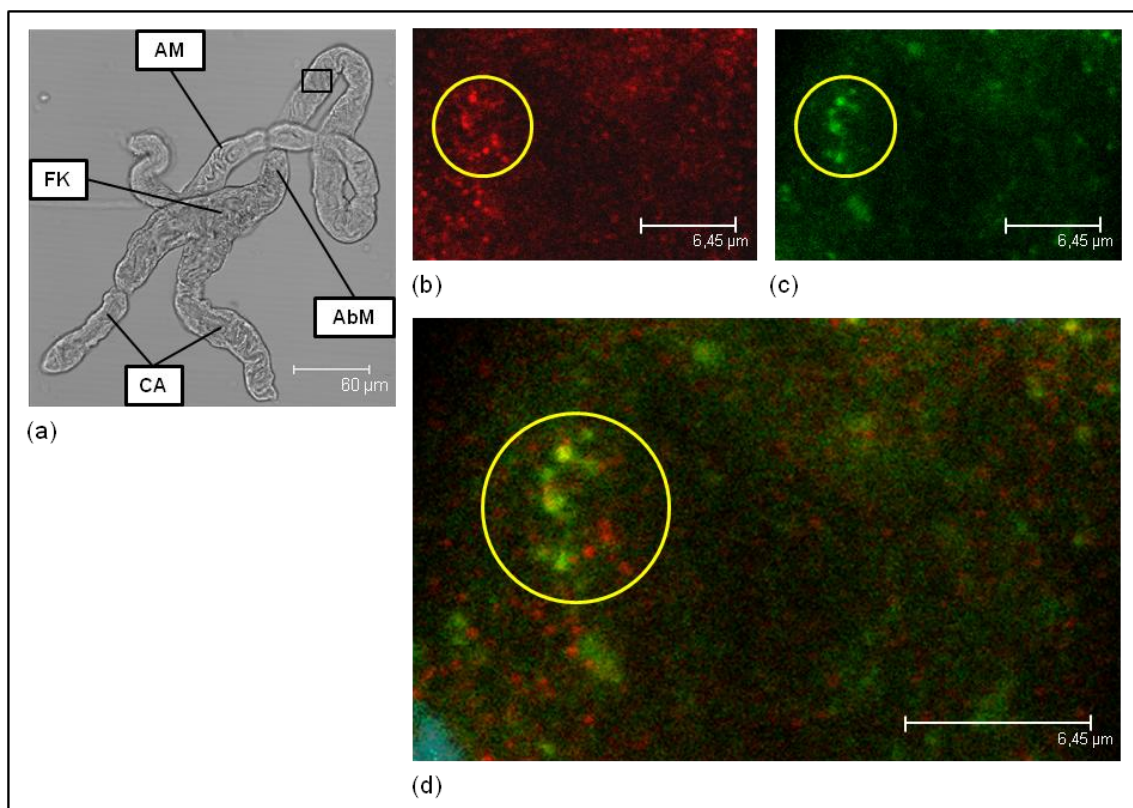


**Abbildung 3.25: Ko-Lokalisierung von WmCSV und Hsp70 in Mitteldärmen von *B. tabaci* Population 63.** (a), (e) Mitteldärme von WmCSV-tragenden Individuen der Population 63 im Durchlicht. AbM absteigender Mitteldarm, AM aufsteigender Mitteldarm, CA caeca (Blinddarm), FK Filterkammer. (b), (f) Nachweis von Hsp70. Fluoreszenzscan jeweils eines Ausschnitts von (a) bzw. (e) im Bereich von 560 bis 600 nm Wellenlänge des Lichts, mit starkem Cy3-Signal des sekundären Antikörpers, nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm). (c), (g) Nachweis von WmCSV. Fluoreszenzscan desselben Ausschnitts von (a) bzw. (e) im Bereich von 510 bis 550 nm Wellenlänge des Lichts, nach Anregung durch Argon/Krypton-Laser (488 nm), mit starkem FITC-Signal im Zytoplasma. (d) Überlagerung von (b) und (c) mit zusätzlicher DAPI-Detektion der Zellkerne (türkisfarben). Ko-Lokalisation in gelben Spots. (h) Überlagerung von (f) und (g). Keine Ko-Lokalisation, nur zufällige Überlagerung im gelben Kreis.

In einer großen Zahl von Mitteldärmen war eine Ko-Lokalisierung nicht festzustellen, obwohl auch hier eine erhöhte *hsp70* Expression vorlag. Im Vergleich mit entsprechenden Kontrollen konnte eine unspezifische Bindung von Antikörpern ausgeschlossen werden, sodass die hier fehlende Ko-Lokalisierung ebenfalls einen Zustand im Mitteldarm widerspiegelt.

Bei Individuen der Population 95 wurden in allen 17 untersuchten Mitteldärmen Signale für WmCSV und Hsp70 nachgewiesen, die jedoch nicht ko-lokalisieren (Daten nicht gezeigt). Eine Ko-Lokalisierung wie bei Population 63 wurde nicht gefunden.

#### Ko-Immunolokalisierung von TYLCV und Hsp70



**Abbildung 3.26: Ko-Lokalisierung von TYLCV und Hsp70 in Mitteldärmen von *B. tabaci* Population 63.** (a) Mitteldarm eines TYLCV-tragenden Individuums von Population 63 im Durchlicht. AbM absteigender Mitteldarm, AM aufsteigender Mitteldarm, CA caeca (Blinddarm), FK Filterkammer. (b) Nachweis von Hsp70. Fluoreszenzscan eines Ausschnitts der Filterkammer von (a) im Bereich von ca. 560 bis ca. 600 nm Wellenlänge des Lichts, mit starkem Cy3-Signal des sekundären Antikörpers, nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm). (c) Nachweis von TYLCV. Fluoreszenzscan desselben Ausschnitts von (a) im Bereich von 510 bis 550 nm Wellenlänge des Lichts, nach Anregung durch Argon/Krypton-Laser (488 nm), mit FITC-Signal des sekundären Antikörpers. (d) Überlagerung von (b) und (c). Wenig Ko-Lokalisierung, im gelben Kreis markiert.

Abbildung 3.26 zeigt einen Mitteldarm eines Individuums der Population 63, in dem die Ko-Lokalisierung zwischen TYLCV und Hsp70 gekennzeichnet ist (gelber Kreis). Eine

Interaktion wurde in 40 Prozent der Mitteldärme von Population 63 gefunden. Hier war eine Ko-Lokalisierung stets schwächer ausgeprägt als in positiven Mitteldärmen der WmCSV-Hsp70-Interaktion (s. Abb. 3.25).

In Mitteldärmen der Population 95 konnte keine Ko-Lokalisierung durchgeführt werden, da eine Detektion von TYLCV aufgrund der geringen Konzentration nicht möglich war (vergleiche Ergebnisse der qPCR).

### **3.8.2 Quantifizierung von *hsp70* mRNA in virusfreien und virustragenden *B. tabaci* der Population 63 und 95**

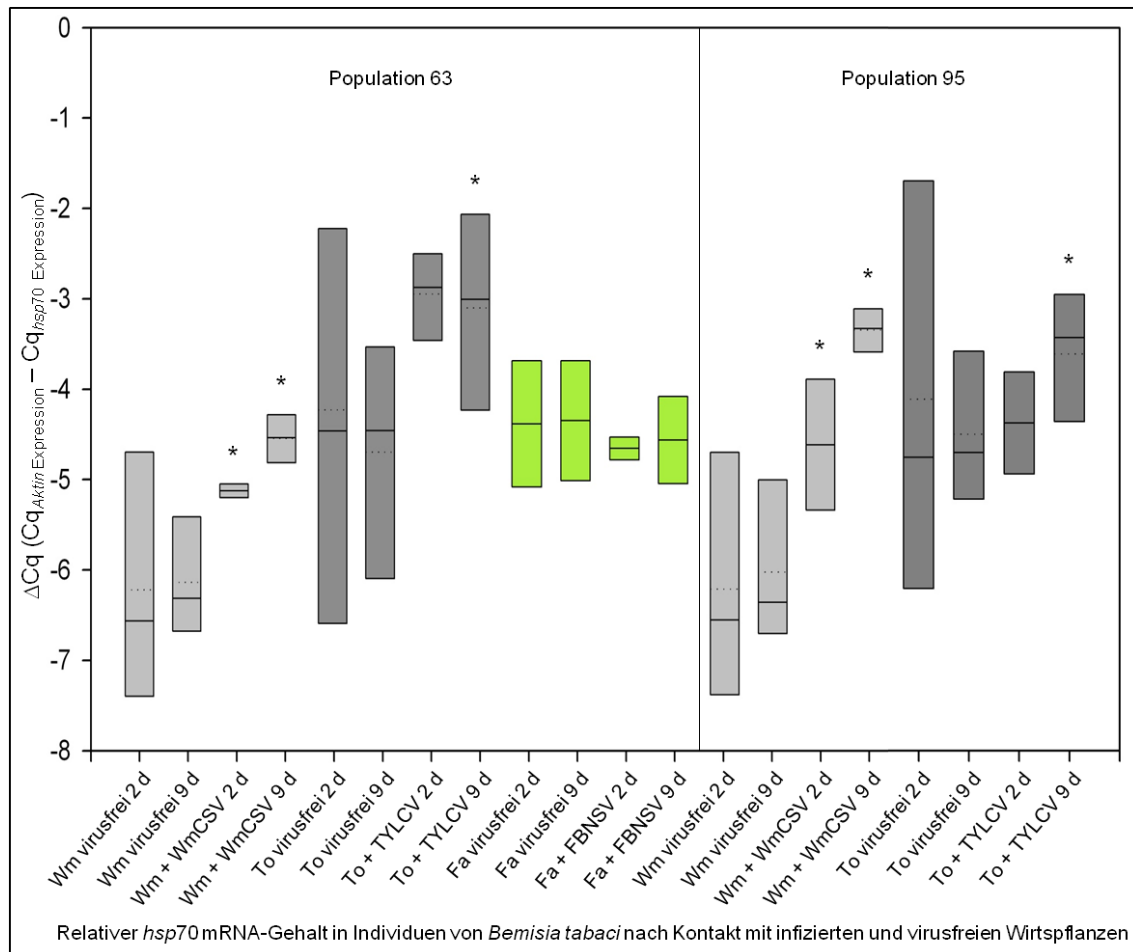
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die *hsp70* Expression in WmCSV und TYLCV tragenden Mitteldärmen von Individuen der Population 63 und 95 erhöht ist. Mit diesem Versuch konnten, durch relative Quantifizierung der *hsp70* mRNA, die Expressionsraten der zugehörigen Gene von Population 63 und 95 verglichen werden.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die *hsp70* Expressionserhöhung spezifisch für die Begomoviren WmCSV und TYLCV ist. Dazu wurden den Weiße Fliegen Wirtspflanzen zur Verfügung gestellt, die mit dem nicht durch *B. tabaci* übertragbaren Nanovirus FBNSV infiziert waren.

#### Quantifizierung von *hsp70* mRNA

Die Expression von *hsp70* in WmCSV und TYLCV tragenden Individuen beider Populationen war bereits zwei Tage nach Virusaufnahme erhöht (Abb. 3.27). Die Faktoren in denen sich die *hsp70* Expressionslevel von virustragenden und virusfreien Individuen unterschieden, sind in Tabelle 3.4 angegeben. Nach neun Tagen war die Expressionserhöhung von *hsp70* bei beiden Viren signifikant. Die Beobachtungen, die am konfokalen Fluoreszenzmikroskop gemacht wurden, waren damit durch qPCR bestätigt.





**Abbildung 3.27: Relative Quantifizierung von *hsp70* mRNA in *B. tabaci* der Population 63 und 95 nach Kontakt mit virusfreien und virusinfizierten Wirtspflanzen nach jeweils 2 und 9 Tagen.** Die Boxen spiegeln die Ansatzmittelwerte für virusfreie Individuen wieder, die aus je 3 Parallelen errechnet sind, sowie die normierten Ansatzmittelwerte für die virustragenden Individuen, die ebenfalls aus jeweils 3 Parallelen errechnet sind. Jede Parallele besteht aus 100 vereinigten Individuen. Jeder Ansatz wurde in 4 Wiederholungen durchgeführt. Die Boxen bestehen somit aus jeweils 4 Ansatzmittelwerten und repräsentieren jeweils 100 % der Daten. Sie haben demnach keine Antennen. Die gepunkteten Linien spiegeln die Gesamtmittelwerte aus den Ansatzmittelwerten wieder, die durchgehenden Linien die Mediane. Zu erkennen ist, dass ein Kontakt mit WmCSV und TYLCV zu einer signifikanten *hsp70* Expressionserhöhung führt. FBNSV hat keinen Einfluss auf die *hsp70* Expression. d (day) Tag, Fa Fababohne, To Tomate, Wm Wassermelone. \* Signifikanter Unterschied zu virusfreien Insekten.

In Individuen der Population 95, die WmCSV aufgenommen hatten, war die relative *hsp70* Expression in stärkerem Maße erhöht, als bei Individuen der Population 63. Demgegenüber war in Individuen der Population 95 die TYLCV aufgenommen hatten, die *hsp70* Expression in geringerem Maße erhöht, als in Individuen der Population 63. Das könnte dadurch begründet sein, dass der Mitteldarm der Population 95 eine sehr starke Barriere darstellt und nur wenige Viren in den Organismus eindringen, was eine geringere *hsp70* Expression erklärt.

**Tabelle 3.4: Faktoren in denen sich die relativen mRNA-Mengen bzw. cDNA-Mengen von virusfreien und virustragenden *B. tabaci* Individuen unterscheiden.** Faktoren sind berechnet nach der Formel  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

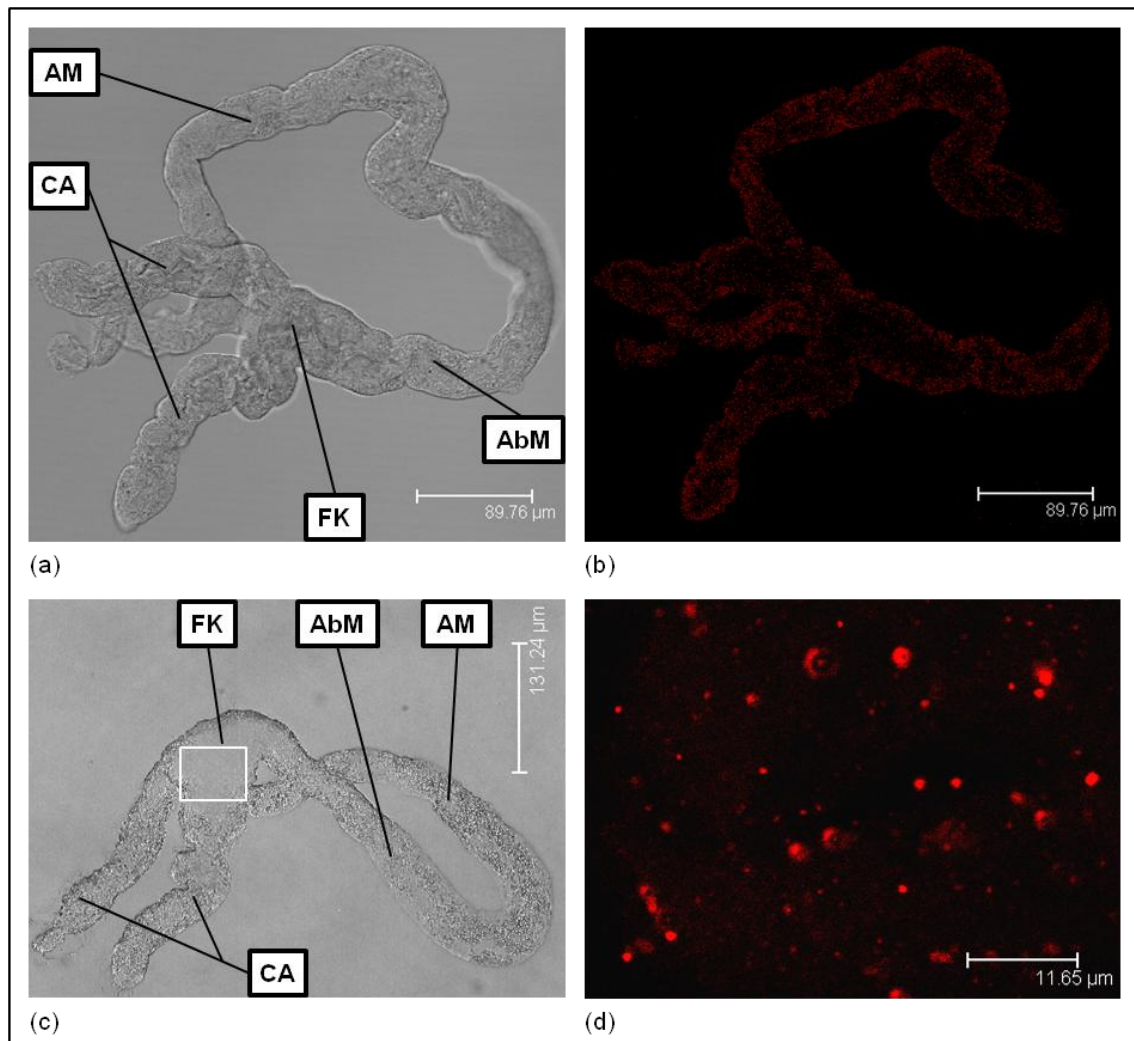
Population	Virus (Wirtspflanze)	Zeitpunkt der Probenahme in Tagen	$\Delta\Delta Cq$	Faktor
63	WmCSV (Wassermelone)	2	-1,08	2,11
		9	-1,51	2,85
	TYLCV (Tomate)	2	-1,29	2,45
		9	-1,59	3,01
	FBNSV (Fababohne)	2	0,28	0,82
		9	0,23	0,85
95	WmCSV (Wassermelone)	2	-1,59	3,01
		9	-2,68	6,41
	TYLCV (Tomate)	2	-0,27	1,21
		9	-0,89	1,85

#### Spezifität der *hsp70* Expressionserhöhung

In Abbildung 3.27 sind zusätzlich die relativen Expressionslevel der *hsp70* Gene von Individuen der Population 63 gezeigt, die auf virusfreien und FBNSV infizierten Fababohnen gehalten wurden (grüne Boxen). Mikroskopische Untersuchungen haben nahegelegt, dass das Nanovirus FBNSV, welches nicht durch *B. tabaci* übertragen wird, Reaktionen in den Darmzellen der Weiße Fliegen hervorruft (s. Punkt 3.7). Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung von *hsp70* mRNA zeigen, dass FBNSV in Insekten, die auf infizierten Fababohnen gehalten wurden, nicht zu einer signifikanten Veränderung der *hsp70* Genexpression führt. Dies konnte ebenfalls mit FBNSV infizierten Erbsen bestätigt werden (nicht gezeigt). Die *hsp70* Expressionserhöhung in *B. tabaci* war somit, in dem begrenzten Betrachtungsrahmen von drei untersuchten Viren, eine spezifische Reaktion gegenüber der Begomoviren WmCSV und TYLCV.

#### **3.8.3 Lokalisierung von Hsp70 und WmCSV in Population 95-**

Nachdem die nicht übertragende Population 95- selektiert war, wurde auch hier in präparierten Mitteldärmen eine Immunolokalisierung von Hsp70 und WmCSV durchgeführt. Dabei wurde wiederum festgestellt, dass die *hsp70* Expression in virustragenden Mitteldärmen erhöht war (Abb. 3.28). Das Signal des anti-Hsp70 Antikörpers trat in einer Vielzahl kleiner Spots auf. Eine Ko-Lokalisierung mit viralen Hüllprotein konnte allerdings nicht dargestellt werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.28: Immunolokalisierung von Hsp70 in Mitteldärmen von *B. tabaci* Population 95-.** (a) Mitteldarm aus virusfreiem Insekt. (b) Fluoreszenzscan von (a) im Bereich von ca. 560 bis ca. 600 nm Wellenlänge des Lichts, mit schwachem Cy3-Signal des sekundären Antikörpers, nach Anregung durch Neon/Helium-Laser (550 nm). (c) Mitteldarm eines WmCSV-tragenden Individuums der Population 95-. (d) Fluoreszenzscan eines Ausschnitts von (c) im Bereich von ca. 560 bis ca. 600 nm Wellenlänge des Lichts, mit starkem Cy3-Signal im Zytoplasma. AbM absteigender Mitteldarm, AM aufsteigender Mitteldarm, CA caeca (Blinddarm), FK Filterkammer.

### 3.8.4 Fütterung von anti-Hsp70 Antikörpern

Nachdem *in vitro* eine Interaktion zwischen Hsp70 und Hüllprotein von WmCSV und TYLCV, sowie die Begomovirus-spezifische Expressionserhöhung von *hsp70* in Weiße Fliegen der Population 63, 95 und 95- festgestellt war, ergab sich die Frage, inwiefern Hsp70 die Virusübertragung unterstützt. Dazu wurden der Population 63 anti-Hsp70 Antikörper gefüttert, die *in vivo* Hsp70 blockieren und somit die Interaktion zwischen Hsp70 und den Hüllproteinen der Begomoviren verhindern sollten. Würde sich daraufhin die Übertragungsrate der Insekten verringern, wäre dies ein Beleg für die

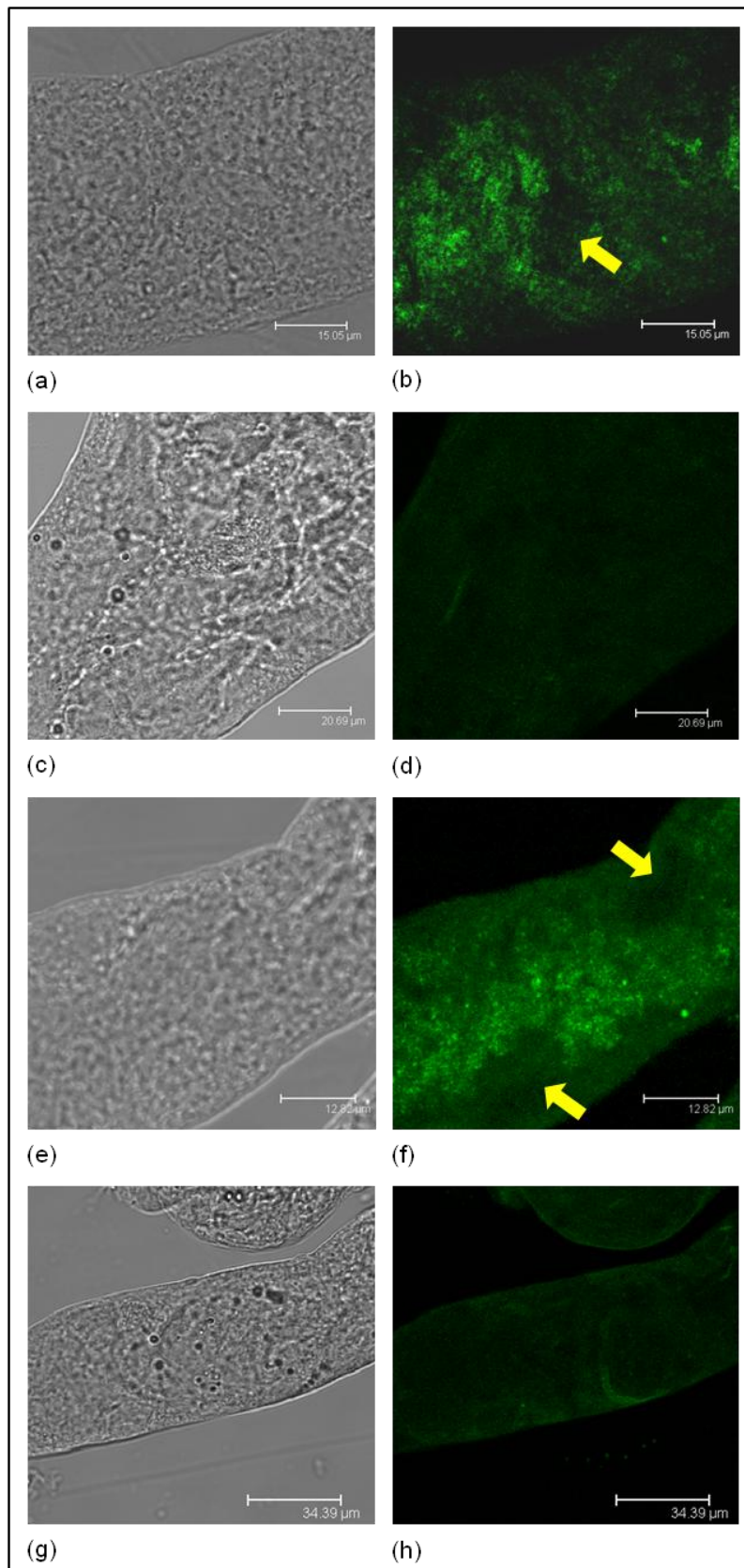


unterstützende Wirkung von Hsp70 bei der Virusübertragung. Um zu prüfen, ob die verschiedenen *B. tabaci* Populationen unterschiedlich auf die Fütterung von anti-Hsp70 Antikörpern reagieren, wurde der Versuch auch mit Population 95- durchgeführt. Zuvor musste jedoch geklärt werden, ob Antikörper überhaupt in Mitteldarmzellen von lebenden *B. tabaci* eindringen können.

#### Lokalisierung der anti-Hsp70 Antikörper

Die Abbildung 3.29 zeigt jeweils zwei Mitteldärme von Individuen der Population 63 und 95-, die mit anti-Hsp70 Antikörpern bzw. Präimmunserum gefüttert wurden. Da ein konfokales Mikroskop zur Antikörperdetektion verwendet wurde, konnten verschiedene Schichten des Mitteldarms gescannt und betrachtet werden. Somit konnte eindeutig festgestellt werden, ob das detektierte Signal der sekundären Antikörper innerhalb der Mitteldarmzellen lokalisiert war oder im Darmlumen verblieb. Das Darmlumen war in der Regel stark zusammengefallen und bildete nur einen schmalen Kanal im Inneren des Mitteldarms.

Das Fluoreszenzsignal der sekundären Antikörper, wurde bei beiden Populationen im Zytoplasma der Mitteldarmzellen, zum Teil gleichmäßig verteilt, zum Teil in großvolumigen wolkenähnlichen Verdichtungen nachgewiesen. Hochkonzentrierte Spots, ähnlich der Virusdetektion, wurden jedoch nicht gefunden. In den Zellkernen wurde kein Signal detektiert (gelbe Pfeile). Durch die Lokalisierung von anti-Hsp70 Antikörpern in den Zellen des Mitteldarms von Population 63 und 95-, war der Beweis erbracht, dass diese Antikörper in den Mitteldarm aufgenommen werden. Somit war für den nachfolgenden Versuch eine wesentliche Voraussetzung erfüllt.



**Abbildung 3.29: Lokalisierung von anti-Hsp70 Antikörpern in Mitteldärmen von *B. tabaci* Population 63 und 95-.**

(a) Ausschnitt des absteigenden Mitteldarms eines mit anti-Hsp70 Antikörpern gefütterten Individuums von Population 63 im Durchlicht.

(b) Fluoreszenzscan von (a) im Bereich von 510 bis 550 nm Wellenlänge des Lichts, nach Anregung durch Argon/Krypton-Laser (488 nm). Signal der FITC markierten sekundären Antikörper (grün) als Nachweis der anti-Hsp70 Antikörper. Kein Signal in Zellkerne (gelber Pfeil).

(c) Ausschnitt des absteigenden Mitteldarms eines mit Präimmunserum gefütterten Individuums von Population 63 im Durchlicht.

(d) Fluoreszenzscan von (c) im Bereich von 510 bis 550 nm Wellenlänge des Lichts, nach Anregung durch Argon/Krypton-Laser (488 nm). Kein Signal der FITC markierten sekundären Antikörper detektierbar.

(e) – (h) Analog untersuchte Mitteldärme von Population 95- mit Antikörperdetektion (f) und fehlendem Signal in der Präimmunserum-Kontrolle (h).

### Infektionsrate von Wirtspflanzen und Bonitur

Nach Fütterung von anti-Hsp70 Antikörpern bzw. Präimmunserum und anschließender Fütterung mit TYLCV Virionen, wurden die Übertragungsraten der Weiße Fliegen überprüft. Die Mittelwerte der Virusmengen in den Weiße Fliegen, sowie die zusammengefassten Ergebnisse der zugehörigen Bonitur aus zwei Wiederholungen, sind in Tabelle 3.5 angegeben.

Die Übertragungsraten von Individuen der Population 63, die mit Präimmunserum behandelt waren, war geringer als die von nativen *B. tabaci* Insekten (s. Punkt 2.16.4). Bei *B. tabaci* der Population 63, denen anti-Hsp70 Antikörper verabreicht worden war, war die Übertragungsrate deutlich erhöht. Die Infektionsrate der Wirtspflanzen lag bei durchschnittlich 79,5 %, während Weiße Fliegen denen Präimmunserum gefüttert wurden, nur zu 54 % Infektionserfolg erzielten. Die Annahme, dass ein Blockieren von Hsp70 zu einer Verringerung der Übertragungsfähigkeit führt, wurde damit widerlegt.

**Tabelle 3.5: Durchschnittlicher TYLCV-Gehalt der Weiße Fliegen und Bonitur der Wirtspflanzen auf TYLCV-Infektion nach Fütterung von *B. tabaci* mit anti-Hsp70 Antikörpern bzw. Präimmunserum und anschließender TYLCV-Fütterung.**

		Nährmedium mit	Mittelwert des TYLCV-Gehalts in Genome je Weiße Fliege	Standardabweichung des TYLCV-Gehalts je Weiße Fliege	Bonitur der Tomaten	
					Anzahl	symptomatisch in %
Population	63	anti-Hsp70	6,133x10 <sup>5</sup>	1,184x10 <sup>6</sup>	45	79,5
		Präimmunserum	6,213x10 <sup>5</sup>	1,758x10 <sup>6</sup>	52	54,0
	95	anti-Hsp70	1,160x10 <sup>2</sup>	5,630x10 <sup>2</sup>	40	0
		Präimmunserum	1,210x10 <sup>2</sup>	6,342x10 <sup>2</sup>	40	0

## 4 Diskussion

### 4.1 *Bemisia tabaci* 63 und 95 sind Populationen der kryptischen Art *Middle East-Asia Minor* 1

*B. tabaci* Populationen 63 und 95 wurden anhand von mtCOI Sequenzanalysen der kryptischen Art MEAM1 zugeordnet. MEAM1 war ursprünglich unter den Namen *Bemisia argentifolii*, bzw. *B. tabaci* Biotyp B bekannt (Bellows *et al.*, 1994). Im Jahr 2005 publizierten De Barro *et al.*, dass es sich bei *B. argentifolii* nicht um eine eigenständige Art handelt, sondern um eine Rasse innerhalb des *B. tabaci*-Komplex. Seit 2011 wird *B. tabaci* als Artenkomplex mit 34 morphologisch nicht unterscheidbaren kryptischen Arten definiert, die sich in mindestens 11 phylogenetische Gruppen einteilen lassen, wovon MEAM1 eine Art in der *Africa/Middle East/Asia Minor* Gruppe darstellt (De Barro *et al.*, 2011; Tay *et al.*, 2012). MEAM1 ist weltweit verbreitet (Kirk *et al.*, 2000; Pascual und Callejas, 2004; Guo *et al.*, 2012) und geriet in den Fokus wissenschaftlicher Aufmerksamkeit, weil sich diese Art in den späten 1980er Jahren stark in Amerika ausbreitete und andere Arten verdrängte (Cohen *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 1995a; Pascual und Callejas, 2004; Muñiz *et al.*, 2011). So waren im Jahr 2011 in 71 % der in Amerika gesammelten Weiße Fliege-Proben Individuen der Art MEAM1 nachzuweisen. 53 % der Proben bestanden ausschließlich aus MEAM1 Individuen (McKenzie *et al.*, 2012). Eine Ursache für die Ausbreitung der MEAM1 ist eine Zunahme in der Insektizidresistenz (Ferreira *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2012).

### 4.2 Unterschiedliche Transmissionsraten von *B. tabaci* 63 und 95

Die Geschlechterverteilung zwischen Männchen und Weibchen liegt bei *B. tabaci* bei 1:1 (Carabali *et al.*, 2005). In Versuchen mit Laborpopulationen wurde gezeigt, dass Männchen eine geringere Infektionskompetenz für TYLCV als Weibchen aufweisen. Es werden in diesem Zusammenhang verschiedene Rezeptoren für die Virusübertragung in beiden Geschlechtern diskutiert (Ghanim *et al.*, 2001a; Czosnek *et al.*, 2002). Aus diesem Grund und aufgrund einer besseren Präparierbarkeit von Organen aus Weibchen, wurden bei Untersuchungen von einzelnen Individuen und Organen in dieser Arbeit stets weibliche Insekten verwendet. Bei Quantifizierungen und Lokalisierungen wurden gleich alte Weiße Fliegen eingesetzt. Diese Synchronisierungen waren erforderlich, um eindeutige Aussagen über die Übertragungsfähigkeit treffen bzw. Vergleiche zwischen den unterschiedlichen *B. tabaci* Populationen herstellen zu können, da sich Übertragungsraten mit dem Alter der

Insekten verändern. So waren 1 bis 2 Wochen alte Weibchen einer israelischen *B. tabaci* Population in der Lage TYLCV zu 100 % zu übertragen, während 3 Wochen alte Weibchen nur noch 60 % und 6 Wochen alte *B. tabaci* nur noch 20 % aller Pflanzen infizieren konnten (Ghanim *et al.*, 2001a). In dieser Arbeit wurden daher synchronisierte Individuen im Alter von 1 bis 2 Wochen verwendet.

Die bisher erhobenen Transmissionsraten anderer *B. tabaci* Populationen wurden meistens von Gruppen von Insekten bestimmt und nur selten anhand von einzelnen Individuen (Lotrakul *et al.*, 2003), was einen Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Transmissionsraten von einzelnen Individuen schwierig macht. Nach 7-tägiger IAP durch einzelne Individuen der Population 63, wurde eine Infektionsrate von Tomaten mit TYLCV, von 96,6 % ermittelt. Wassermelonen wurden analog zu 32,4 % mit WmCSV infiziert. Bei einer Übertragung des *Squash leaf curl virus* (SLCV), durch 3 bis 5 weibliche Individuen *B. tabaci* MEAM1 aus den USA pro Kürbispflanze, wurde eine Transmissionsrate zwischen 70 und 100 % ermittelt (Rosell *et al.*, 1999). Gruppen von 20 oder mehr Individuen der Population 63 erzielten in dieser Arbeit für beide Viren je eine 100%ige Infektion von 15 Tomaten bzw. Wassermelonen bei einer IAP von mindestens 3 Tagen. Ähnlich verhält es sich, wenn 15 oder mehr Individuen von *B. tabaci* MEAM1 aus Amerika TYLCV auf eine Wirtspflanze übertragen. Die Infektionsrate der Pflanzen liegt dann ebenfalls bei 100 % (Mehta *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu waren die Transmissionsraten der Population 95 aus dem Sudan ähnlich wie die der Begomoviren *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) und *Ipomoea leaf curl virus* (ILCV), für die Transmissionsraten zwischen 5 und 20 % ermittelt wurden, was aber für die Verbreitung der Viren völlig ausreichend ist (Valverde *et al.*, 2004). Obwohl also die Population 95 weitaus geringere Transmissionsraten für Begomoviren aufweist, ist sie in der Lage Viren effektiv zu verbreiten, was vor allem durch das hohe Vermehrungspotential der Insekten begründet ist.

#### **4.3 Endosymbionten sind nicht für die Effizienz der Virusübertragung durch *B. tabaci* verantwortlich**

Da die Möglichkeit bestand, dass die unterschiedlichen Übertragungsraten der *B. tabaci* Population 63 und 95 auf einer unterschiedlichen Besiedelung mit sekundären prokaryotischen Endosymbionten beruht, wurden die Endosymbionten dieser *B. tabaci* Populationen charakterisiert.

Beispielsweise interagiert das von prokaryotischen Endosymbionten synthetisierte Chaperon GroEL *in vitro* mit dem Hüllprotein von TYLCV (Morin *et al.*, 2000; Akad *et al.*, 2004). Eine Fütterung von *B. tabaci* mit anti-GroEL Antikörpern, verhinderte die

Bindung zwischen TYLCV und GroEL und führte zu einer Reduktion des TYLCV-Gehaltes in der Hämolymphe der Insekten und zu einer Abnahme der TYLCV-Übertragung von über 80 % (Morin *et al.*, 1999). In Wirtspflanzen exprimiertes GroEL bindet an TYLCV, was zur Folge hat, dass die transgenen Pflanzen resistent sind (Akad *et al.*, 2007). Für den Endosymbionten *Buchnera aphidicola*, der in Aphiden persistiert, wurde beschrieben, dass ein von ihm synthetisiertes GroEL-Homolog spezifisch an das *Potato leafroll virus* (PLRV) bindet. GroEL ermöglicht hier die Transmission, durch Schutz der Virionen in der Hämolymphe auf dem Weg zu den Speicheldrüsen. Fünf von sechs Aminosäuren in der Äquatorialdomäne vom *Buchnera* GroEL sind essentiell für eine Interaktion mit dem PLRV Hüllprotein und somit für eine PLRV Transmission (Hogenhout *et al.*, 2000). Die GroEL-Proteine von *Buchnera* und vom in *B. tabaci* vorkommenden Endosymbionten *Candidatus Hamiltonella defensa* sind an dieser Stelle konserviert, worauf die Hypothese basiert, dass das GroEL von *Hamiltonella* ebenfalls essentiell für die Transmission von Viren durch Weiße Fliegen ist. Individuen der nicht Geminivirus übertragenden kryptischen Art *Mediterranean* aus Israel besitzen kein *Hamiltonella*, jedoch *Arsenophonus*, *Rickettsia*, *Wolbachia* und *Candidatus Portiera aleyrodidarum*, die ebenfalls spezifische GroEL-Proteine synthetisieren. Diese interagieren jedoch nicht mit dem Hüllprotein von TYLCV, da die Äquatorialdomäne deren GroEL-Homologe Substitutionen im Vergleich zu den GroEL von *Hamiltonella* und *Buchnera* aufweisen. Gefüttertes GroEL von *Hamiltonella* interagiert aber in der Hämolymphe von *B. tabaci* Individuen von *Mediterranean* mit TYLCV. Es wird daher vermutet, dass in der Hämolymphe von *Mediterranean*, das Fehlen eines GroEL, welches an TYLCV binden kann, der Grund dafür ist, dass diese Art TYLCV nicht überträgt (Gottlieb *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurde mittels PCR ausgeschlossen, dass Unterschiede in der Besiedelung mit sekundären Endosymbionten und damit unterschiedliche GroEL-Proteine, die Ursache für die verschiedenen Übertragungsraten der Populationen ist. So wurden *Hamiltonella*, *Rickettsia* und *Wolbachia* mittels PCR in beiden Populationen jeweils annähernd gleichhäufig nachgewiesen. Der geringen Übertragungsrate von Population 95 müssen daher andere Ursachen zugrunde liegen.

*Arsenophonus*, *Cardinium* und *Fritschea* konnten nicht in den zwei Populationen nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit veröffentlichten Beobachtungen, in denen *Fritschea* nicht und *Arsenophonus* und *Cardinium* viel seltener in MEAM1 gefunden wurden, als die anderen für diese Art bekannten sekundären Endosymbionten (Chiel *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2012b, c).

#### 4.4 Die Aufnahme von WmCSV und TYLCV aus artifiziellem Medium führt zu gleichen Konzentrationen in *B. tabaci* Population 63

Péréfarres *et al.* (2011) haben festgestellt, dass das bipartite *Potato yellow mosaic virus* (PYMV) in Wirtspflanzen höher konzentriert ist, als drei untersuchte monopartite Begomoviren.

In dieser Arbeit ist ebenfalls der Gehalt des bipartiten WmCSV in jungen infizierten Wassermelonen, mit durchschnittlich  $7 \times 10^8$  Moleküle pro 100 ng DNA, um das 9,4-fache höher als der Gehalt des monopartiten TYLCV in Tomaten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der unterschiedliche Gehalt an WmCSV und TYLCV in Individuen von *B. tabaci* auf den erwähnten Unterschieden in den Wirtspflanzen beruht. Werden gleiche Konzentrationen an WmCSV und TYLCV gefüttert, sind auch die aufgenommenen Virusmengen in den Individuen der Population 63 gleich. Bei Population 95 gibt es aufgrund der Barrierewirkung des Mitteldarms Unterschiede in der Konzentrationsbestimmung der Viren, da für TYLCV bereits die äußere Membran des Mitteldarms eine sehr starke Barriere darstellt, dies jedoch für WmCSV nicht der Fall ist.

Für den Thrips *Frankliniella occidentalis* ist bekannt, dass ein Individuum das *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, Gattung *Tospovirus*) effizienter überträgt, wenn der Virustiter im Insekt hoch ist (Rotenberg *et al.*, 2009). Deshalb ist es für Quantifizierungen erforderlich, zu überprüfen bzw. sicherzustellen, dass zu vergleichende Versuchstiere eine möglichst definierte gleichbleibende Virusmenge durch Wirtspflanzen bzw. Nährmedium zu Verfügung bekommen. Ebenso muss die Aufnahmezeit (AAP) klar definiert sein. Ghanim *et al.* (2001a) zeigten, dass bei einer gut TYLCV übertragenden MEAM1 Population aus Israel, ausschließlich nach einer AAP von mindestens 48 Stunden, in Kombination von einer IAP von mindestens 24 Stunden, die Infektionsrate von Wirtspflanzen maximal war. Für die Untersuchung von Population 63 und 95 in dieser Arbeit, wurde eine AAP festgelegt, die deutlich über 48 Stunden liegt, um Schwankungen in der Virusbeladung durch eine zu kurze AAP zu minimieren.

Ein direkter Vergleich von Daten dieser Arbeit, die nach Virusaufnahme von Pflanzen erhalten wurden, mit Daten nach Fütterung mit Nährlösung, ist nicht möglich, da sich die für Pflanzen gemessenen Viruskonzentrationen auf gesamte Blätter beziehen. So sind bestimmte Begomoviren, wie beispielsweise TYLCV oder *Abutilon mosaic virus* (AbMV) Phloem limitiert (Levy und Czosnek, 2003; Peretz *et al.*, 2007), d.h. die Viren sind auf die Zellen der Leitbündel konzentriert. Innerhalb der Versuche können jedoch Faktoren ermittelt werden, die das Verhältnis zwischen Viruskonzentration von Virusquelle und von je einem Individuum *B. tabaci* widerspiegeln (s. Tab. 6.3). Diese

Faktoren können miteinander verglichen werden. Der Vergleich zeigt zum einen, dass beide Populationen aus Wirtspflanzen mehr WmCSV (durchschnittlicher Faktor:  $\approx 8,4$ ) und TYLCV ( $\approx 2,6$ ) aufnehmen, als aus der Saccharoselösung. Da zum anderen der Faktor für WmCSV größer ist, wird im Vergleich zur Fütterung mit Pflanzen weniger WmCSV aus der Saccharoselösung aufgenommen. Dies führt zu der Vermutung, dass bei Änderungen des Virusgehalts in der Quelle (Pflanze oder Medium), sich der Virusgehalt in den Weiße Fliegen ebenfalls, aber nicht proportional ändert. Diese Beobachtungen bestätigen, dass die Virusaufnahme über das Nährmedium Ergebnisse generiert, die nicht denen natürlicher Gegebenheiten entsprechen. Um natürlichen Bedingungen näher zu kommen, sollte die Virusaufnahme, so wie in dieser Arbeit hauptsächlich praktiziert, mit infizierten Pflanzen durchgeführt werden.

#### **4.5 Die unterschiedlichen Virusmengen zwischen Population 63 und 95 sind nicht auf ein unterschiedliches Saugverhalten zurückzuführen**

Es ist bekannt, dass unterschiedliches Verhalten von Insekten zu unterschiedlicher Virusübertragung führen kann (Ferreles und Moreno, 2009).

Durch die quantitative Ermittlung der Virusaufnahme durch *B. tabaci* nach einer Hungerphase, konnte in dieser Arbeit auf das Fressverhalten der Populationen rückgeschlossen werden. Weiße Fliegen der Population 63 und 95 hatten bereits eine Stunde nach Transfer auf infizierte Wirtspflanzen, im Anschluss an einen Hungerstress, eine hohe Virusmenge aufgenommen. Die frühe Detektion von WmCSV in Individuen der Populationen 63 und 95, steht im Einklang mit der minimalen Zeitspanne von 1,8 Minuten, die benötigt wird, um nach Transfer von virustragenden Weiße Fliegen auf virusfreie Wirtspflanzen, TYLCV in das Phloem zu inokulieren (Jiang *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass auch die Aufnahme von Begomoviren aus dem Phloem infizierter Pflanzen einen ähnlich geringen Zeitraum in Anspruch nimmt. So wurde TYLCV nach einer AAP von 10 Minuten im Kopf einer gut übertragenden Population aus Israel nachgewiesen, nach 40 Minuten im Mitteldarm und nach 90 Minuten in der Hämolymphe (Ghanim *et al.*, 2001a).

Durch den Hungerstress wurde sichergestellt, dass die Weiße Fliegen sofort nach Transfer auf die Wirtspflanzen zu saugen begannen. Die ermittelte gleichmäßige Virusaufnahme der Populationen 63 und 95 über einen Zeitraum von mindestens 16 Stunden, widerlegt die Behauptung, dass der Unterschied im Gehalt, der nach 5 Tagen deutlich bei entladenen Weiße Fliegen hervortritt (s. Punkt 3.2.3), auf ein unterschiedliches Aufnahmeverhalten zurückzuführen ist. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass innerhalb der Insekten von Population 95 Virusbarrieren existieren, die



nach weniger als 5 Tagen (unter Betrachtung des Versuchs 3.2.3 nach weniger als 48 Stunden) zu einem geringeren Virusgehalt in entladenen Individuen der Population 95 führen.

Individuen einer *B. tabaci* MEAM1 Population aus Sardinien wurden für eine AAP von 48 Stunden Pflanzen ausgesetzt, die mit dem *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV) infiziert waren. Über diesen Zeitraum, stieg der Virusgehalt in den Weiße Fliegen sehr schnell an. Mittels Chemilumineszenz-Punkt-Blot Analyse wurde die Menge der aufgenommenen Viren quantifiziert. In Individuen, die 4 bis 48 Stunden an infizierten Tomaten gesaugt hatten, wurden 0,5 bis 1,6 ng an TYLCSV-DNA nachgewiesen (Caciagli und Bosco, 1997). Bei einer Genomgröße von 2793 Nukleotiden, entspricht dies einer Molekülzahl an TYLCSV-Genomen von rund  $8,3 \times 10^7$  bis  $2,7 \times 10^8$  pro weiblichem Individuum *B. tabaci*. In dieser Arbeit weisen ganze Individuen der Population 63, nach einer AAP von 5 Tagen, mit  $4,1 \times 10^6$  TYLCV-Genome (Median), einen ca. 100-fach geringeren Wert auf. Czosnek *et al.*, (2002) quantifizierten die Aufnahme von TYLCV durch eine *B. tabaci* Population aus Israel. Die erhaltenen Quantifizierungsdaten liegen mit ca.  $6,0 \times 10^8$  Viren pro Weiße Fliege, ebenfalls rund 100-mal höher als der Wert, der nach Quantifizierung mittels qPCR für *B. tabaci* Population 63 in dieser Arbeit ermittelt wurde. Im Gegensatz zur TYLCSV-Aufnahme, ist bei der israelischen Population nach 12 Stunden ein Maximalwert erreicht. Dieser Wert wurde mittels Western Blot und anschließendem Autoradiogramm erstellt, indem die Virusgenome mithilfe viraler DNA Standards quantifiziert wurden. Die vorliegenden Daten belegen, dass es für Aufnahmemengen und -maxima von verschiedenen oder gleichen Viren, durch verschiedene Populationen von *B. tabaci*, sehr unterschiedliche Ergebnisse geben kann, deren Vergleich aufgrund von unterschiedlichen Methoden sehr schwierig ist. Ursachen für den großen Unterschied in den quantifizierten Virusmengen, können Unterschiede im Virusgehalt der eingesetzten Wirtspflanzen sein, die Tatsache, dass unterschiedliche Populationen von *B. tabaci* untersucht wurden, dass in Israel mit nicht entladenen Insekten gearbeitet wurde und dass die verwendeten Methoden Sensitivitätsunterschiede aufweisen.

Die Aufnahme von WmCSV durch die Population 63 lag in dieser Arbeit nach 16 Stunden bei ca.  $2,3 \times 10^7$  Genome. Ein Maximum, so wie von Czosnek *et al.* (2002) für TYLCV gezeigt, war damit jedoch noch nicht erreicht. Mit längerer AAP stieg auch der Gehalt an WmCSV in den Weiße Fliegen. Nach 5 Tagen war der Wert auf ca.  $1,6 \times 10^8$  Viren pro Individuum angestiegen. Auch Rosell *et al.* (1999) postulierten für die Aufnahme des bipartiten Begomovirus SLCV durch *B. tabaci* MEAM1 aus den USA, dass je länger die AAP ist, desto höher ist auch die Virusdetektion mittels PCR, sowie die Übertragung.

#### 4.6 Selektion einer nicht übertragenden *B. tabaci* Population aus der schwach übertragenden Population 95

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal durch gezielte Selektion, aus der schwach übertragenden Population 95, eine Subpopulation (95-) erhalten, die die Begomoviren WmCSV und TYLCV nicht zu übertragen vermag. Unterschiede in den Übertragungsraten, wie sie in dieser Arbeit für die MEAM1 Populationen 63, 95 und 95- beschrieben sind, wurden bisher nur für Populationen unterschiedlicher kryptischer Arten ausgemacht. So wurden beispielsweise in China 12 Populationen von MEAM1 und 43 Populationen von *Mediterranean* untersucht. Die Populationen der kryptischen Art *Mediterranean* zeigten dabei eine überlegene Aufnahme- und Übertragungsfähigkeit von TYLCV. Individuen von *Mediterranean* nahmen signifikant mehr virale DNA auf als jene von MEAM1 (Pan *et al.*, 2012a). Von Unterschieden zwischen Populationen innerhalb einer kryptischen Art, wird nicht berichtet.

Ähnlich verhält es sich bei anderen Pflanzenviren und ihren Vektoren. So ist beispielsweise vom *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Bromoviridae*) bekannt, dass es durch verschiedene Aphidenspezies unterschiedlich gut bzw. schlecht übertragen wird (Gildow *et al.*, 2008). Unterschiedliche Transmissionsraten zwischen Populationen einer Art wurden bereits bei blutsaugenden Insekten gefunden. So lag bei autogenen Populationen der Stechmücke *Aedes caspius*, die Übertragungsrate des *Rift Valley fever virus* (RVFV, *Bunyaviridae*) bei 23,1 %, bei anautogenen Populationen bei 9,7 % (Gad *et al.* 1987).

#### 4.7 Quantifizierung und Lokalisierung von WmCSV und TYLCV und ihre Barrieren in Population 95 und 95-

Ein Vergleich der Virus-Quantifizierungsdaten von Population 95- mit Daten der Ursprungspopulation 95, sowie mit der gut übertragenden Population 63 bestätigte, dass Mitteldarm und Speicheldrüsen entscheidende Barrieren für den Virustransport darstellen können.

Der Mitteldarm stellt in Population 95- für WmCSV eine schwache und für TYLCV eine starke Barriere dar

In dieser Arbeit ließen sich WmCSV in den Populationen 63, 95 und 95- und TYLCV in Population 63, besonders stark in den Filterkammern, den Blinddärmen und den absteigenden Mitteldärmen mittels FISH nachweisen. Da die DNA der Viren aber noch

kein eindeutiger Beweis für das Vorhandensein von intakten Viren ist, wurden zusätzlich die Hüllproteine mittels Immunodetektion nachgewiesen und in einer Ko-Lokalisierung mit der DNA-Detektion der FISH verglichen, was zeigte, dass Hüllprotein und DNA an gleichen Stellen lokalisiert sind (nicht gezeigt). TYLCV wurde mittels Immunolokalisierung ebenfalls in der Filterkammer und im absteigenden Mitteldarm, einer gut übertagenden *B. tabaci* MEAM1 Population aus Israel, nachgewiesen (Czosnek *et al.*, 2002; Brown und Czosnek, 2002). Ähnliche Beobachtungen wurden für die Begomoviren *Tomato mottle virus* (ToMoV) und *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV) gemacht. Mittels fluoreszierenden Antikörpern wurden die Viren in der Filterkammer und im vorderen Bereich des Mitteldarms von *B. tabaci* MEAM1 Individuen aus Florida lokalisiert. CabLCV konnte in 16 % der untersuchten Organe nachgewiesen werden, ToMoV in nur 3 % (Hunter *et al.*, 1998). Die WmCSV-Lokalisierung mit fluoreszierenden Sonden in dieser Arbeit, war in allen drei Populationen wesentlich häufiger möglich. Ebenso der TYLCV-Nachweis in Population 63.

Auch andere Geminiviren, wie das *Maize streak virus* (Gattung *Mastrevirus*), wurden in den Zellen der Filterkammer und des vorderen Mitteldarms ihrer Zikadenwirte lokalisiert. Hier wurden die Viren in großen membranumschlossenen Ansammlungen innerhalb der Zellen gefunden. Die Virus-Übertragung mittels Endozytose wird diskutiert (Ammar *et al.*, 2009). Bei Weiße Fliegen einer MEAM1 Population aus Israel wurde TYLCSV in den Zellen des Mitteldarms mittels Immunogold-Markierung in ca. 1  $\mu\text{m}$  großen Vesikeln nachgewiesen (Medina *et al.*, 2006). Unklar ist, ob diese Vesikel zum Virustransport beitragen. Ebenso ist ein Zusammenhang zwischen ihnen und den in FBNSV tragenden Mitteldärmen gefundenen, ca. 6  $\mu\text{m}$  großen, Vesikeln dieser Arbeit unklar. Da im Fall von FBNSV der Mitteldarm die finale Barriere darstellt, wird vermutet, dass es sich bei diesen vesikulären Strukturen um einen aktiven Virusabwehrmechanismus durch Lysosomen handeln könnte. Wobei zu bemerken ist, dass hier die durchschnittliche Größe von Lysosomen von 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  (Alberts *et al.*, 2004) deutlich überschritten wird.

Im Gegensatz zu TYLCV in Population 95 und 95-, wurden Begomoviren, die nicht durch *B. tabaci* MEAM1 übertragen werden, wie das AbMV aus Israel, in Mitteldärmen von *B. tabaci* nachgewiesen, jedoch nicht in deren Hämolymphe. Obwohl ein prinzipieller Schutz der Viren in der Hämolymphe durch GroEL besteht, *in vitro* bestätigt durch Bindung an das Hüllprotein von AbMV, sind diese Viren nicht in der Lage den Mitteldarm zu überwinden (Morin *et al.*, 2000). Somit scheint hier die innere Membran die unüberwindbare Barriere zu sein, wohingegen in Population 95 und 95- für TYLCV die äußere Membran des Mitteldarms eine sehr starke Barriere darstellt. Bei

*B. tabaci* MEAM1 Individuen aus Israel, wurde für ein nicht übertragbares Isolat des *African cassava mosaic virus* (ACMV), ebenfalls die äußere Membran des Mitteldarms, als absolute Barriere charakterisiert (Medina *et al.*, 2006). Ähnlich verhält es sich bei der in gemäßigten Klimazonen heimischen Weiße Fliege *Trialeurodes vaporariorum*, deren Mitteldarm für TYLCV ebenfalls eine absolute Barriere darstellt (Czosnek *et al.*, 2002). Ob für die Nicht-Überwindung der äußeren Mitteldarmmembranen, für die genannten Viren und Weiße Fliege Populationen, homologe molekulare Faktoren verantwortlich sind, bleibt zu klären.

Quantifizierungsdaten aus DNA der Nicht-Wirtspflanzen (s. Punkt 2.18) unterstützen die Vermutung, dass die Population 95 und 95-, in den ersten zwei Tagen der Entladung, den Großteil der aufgenommenen Viren über den Honigtau wieder ausscheiden. Denn in extrahierter DNA der Baumwollblätter ließen sich nach Tag eins und Tag zwei mehr Viren nachweisen, als in der DNA der Pflanzen auf denen Individuen der Population 63 entladen wurden. Dadurch wird die Vermutung gestützt, dass die Individuen von Population 63 in den ersten zwei Tagen sehr viele Viren in ihren Organismus aufnehmen und nur zu geringeren Anteilen über Honigtau abgeben als Population 95 und 95-. Die Beobachtung wird dennoch lediglich als Indiz und nicht als Beweis gewertet, da sich zum einen die Insekten nicht gleichmäßig auf den Nicht-Wirtspflanzen verteilten und nicht alle Blätter der Pflanzen parallel untersucht wurden. Zum anderen konnte im Vergleich zu der Vielzahl an untersuchten Weiße Fliegen aber nur eine geringe Anzahl an Nicht-Wirtspflanzen untersucht werden (Daten nicht gezeigt).

Das nicht durch Weiße Fliegen übertragbare Nanovirus FBNSV ließ sich mittels qPCR in dieser Arbeit in entladenen Mitteldärmen von *B. tabaci* nachweisen, nicht aber in deren Hämolymphe. Somit wird für dieses Virus die innere Membran des Mitteldarms als absolute Barriere für FBNSV als sehr wahrscheinlich eingeschätzt, was einen Kontrast zur TYLCV-Blockade an der äußeren Membran der Population 95 und 95- darstellt. FBNSV wird unter anderem von der Erbsenlaus *Acyrtosiphon pisum* übertragen (Saunders *et al.*, 2002; Vetten *et al.*, 2005; Grigoras *et al.*, 2010a, b). Bei Aphiden, wie *Pentalonia nigronervosa*, ließ sich beispielsweise das Nanovirus *Banana bunchy top virus* (BBTV) in Mitteldarm und Speicheldrüsen nachweisen (Bressan und Watanabe, 2011). Neben der Wirtsspezifität für Aphiden, sind keine genauen Ursachen für die Nicht-Übertragbarkeit von FBNSV durch Weiße Fliegen bekannt.

Ghanim *et al.* (2001b) beschreiben den Mitteldarm von *B. tabaci* als Organ mit großen Epithelzellen, die wiederum große Zellkerne aufweisen. In dieser Arbeit wurden WmCSV und bei Population 63 auch TYLCV verstärkt in unmittelbarer Nähe dieser großen Zellkerne nachgewiesen. Jedoch niemals in den Zellkernen. Für tierische Viren,

wie das *Mouse hepatitis coronavirus* (MHV), ist bekannt, dass das raue Endoplasmatische Retikulum und der Golgi Komplex eine wesentliche Rolle beim vesikulären Transport von Viren spielen (Krijnse-Locker *et al.*, 1994). Das raue Endoplasmatische Retikulum bildet mit der äußeren Kernmembran ein Kontinuum, und umgibt den Zellkern in der Regel unmittelbar (Alberts *et al.*, 2004). Ob ein Zusammenhang besteht zwischen dem vesikulären Transport der Zellen, mit möglicher anschließender Exozytose ins Hämocoel und der verstärkten Lokalisierung der Begomoviren um die Zellkerne des Mitteldarms von *B. tabaci*, sowie dem Virustransport vom Mitteldarm in die Hämolymphe, könnten zukünftige Untersuchungen zeigen.

#### Virustransport durch die Hämolymphe

Zirkulativ übertragende Begomoviren werden nicht sofort mit Beginn der AAP weitergegeben. Zwischen Beginn der AAP und Übertragung liegt eine Latenzzeit, in der die Viren zuerst den Verdauungstrakt passieren, dann mit der Hämolymphe zu den Speicheldrüsen gelangen, in die Speicheldrüsen eindringen und schließlich mit dem Speichel ausgeschieden werden. Die Latenzzeit beträgt beim bipartiten Begomovirus SLCV 6 bis 8 Stunden (Rosell *et al.*, 1999). TYLCV wurde acht Stunden nach Beginn der AAP in den primären Speicheldrüsen von gut übertragenden *B. tabaci* MEAM1 detektiert. Die Latenzzeit kann je nach experimentellen Bedingungen aber auch wesentlich länger sein (Ghanim *et al.*, 2001b; Czonek *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit ließ sich TYLCV in der Hämolymphe der Population 63 zwei Stunden nach Beginn der AAP quantifizieren. Da die Mitteldärme von Individuen der Population 95 und 95- sehr starke, jedoch keine absoluten Barrieren für TYLCV darstellen, war hier ebenfalls ein geringer Virusgehalt in der Hämolymphe nachzuweisen. Es wird angenommen, dass aufgrund der starken Barrierewirkung der Mitteldärme von Population 95 die Detektion des Virus hier um zwei Stunden verzögert war. Da die Quantifizierung für die Population 95- nachträglich durchgeführt wurde und somit andere jahreszeitliche Bedingungen herrschten, die große Standardabweichungen zu Beginn der AAP verursachen, war hier eine Detektion ebenfalls nach 2 Stunden möglich. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit jenen einer israelischen gut übertragenden *B. tabaci* Population, bei der die TYLCV-DNA mittels herkömmlicher PCR bereits eine Stunde nach Beginn der AAP in der Hämolymphe nachgewiesen wurde (Czosnek *et al.*, 2002). Bei einer *B. tabaci* MEAM1 Population aus den USA wurde nach einer AAP von zwei Stunden SLCV in der Hämolymphe nachgewiesen, nach 30 Minuten jedoch noch nicht (Rosell *et al.*, 1999).

Über einen Zeitraum von 6 Tagen blieb der TYLCV-Gehalt in Population 95 und 95- wesentlich unterhalb dessen von Population 63, was wiederum für eine starke Barrierewirkung des Mitteldarms für TYLCV in der schwach und der nicht übertragenden Population spricht. Ähnliches wurde in der Begomovirus nicht übertragenden Gewächshaus Weiße Fliege *Trialeurodes vaporariorum* beobachtet, wo SLCV innerhalb von Extrakten ganzer Insekten detektiert wurde, jedoch nicht in Saccharose-Medien von denen sich die virustragenden Insekten ernährten. In der Hämolymphe von *Trialeurodes vaporariorum* konnte SLCV ebenfalls nicht nachgewiesen werden, was auch hier den Mitteldarm als entscheidende Barriere charakterisiert (Rosell *et al.*, 1999).

Für WmCSV stellt die äußere Membran des Mitteldarms von Population 95 und 95- zwar eine stärkere Barriere dar, als die äußere Membran der Population 63, dennoch können bei allen drei Populationen sehr viele Viren diese Membran passieren. Die innere Membran des Mitteldarms und/oder die Hämolymphe sind in allen drei Populationen, wie man anhand der relativen Quantifizierungen mit Hämolymphe sehen kann, ebenfalls nur schwache Barrieren. So konnte WmCSV in dieser Arbeit nach spätestens 6 Stunden in der Hämolymphe aller drei Populationen nachgewiesen werden. Die relative Quantifizierung enthüllt jedoch auch, dass der WmCSV-Gehalt in der Hämolymphe der Populationen 95 und 95- über eine AAP von 6 Tagen durchschnittlich leicht unterhalb von dem der gut übertragenden Population 63 bleibt. Eine Erklärung für diesen Unterschied könnten unterschiedliche Transportgeschwindigkeiten der Viren in Mitteldarm und Hämolymphe sein. Eine stärkere Abnahme in der Hämolymphe durch möglichen Abbau von WmCSV, wurde in dieser Arbeit ausgeschlossen, da der aufgenommene relative WmCSV-Gehalt in den Populationen 63, 95 und 95-, nach Übersetzen der Weiße Fliegen auf Nicht-Wirtspflanzen, in der Hämolymphe über einen Zeitraum von 6 Tagen relativ stabil bleibt. Gleiches gilt für TYLCV, was vereinbar ist, mit der Interaktion zwischen TYLCV und endosymbiontischen GroEL-Homologen, die einen Abbau der Viren in der Hämolymphe verhindern (Akad *et al.*, 2004).

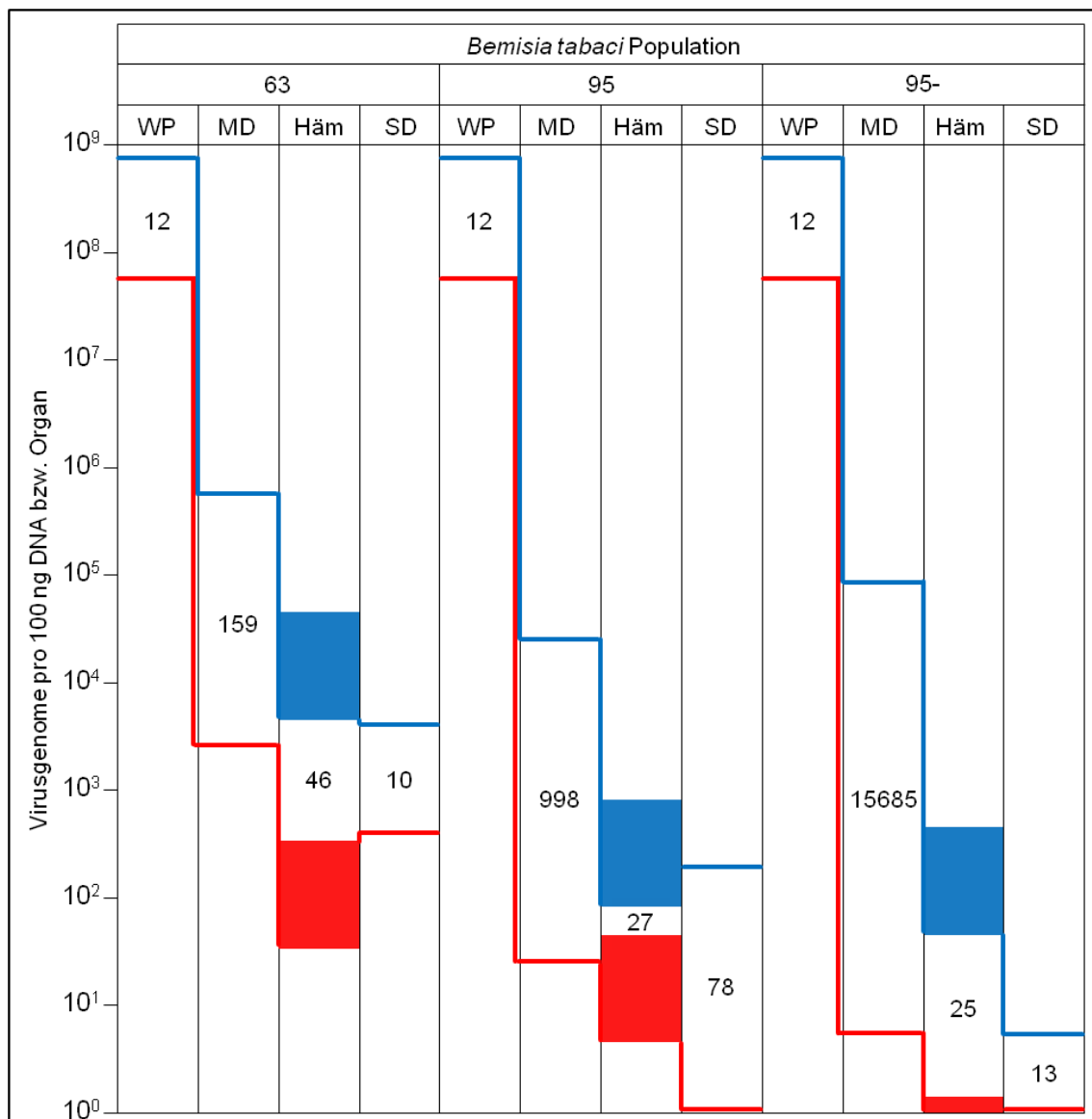
Für übertragende Weiße Fliegen wird diskutiert, dass Microvilli die Aufnahme der Viren in die Zellen des Mitteldarms bzw. den Weitertransport in die Hämolymphe begünstigen (Czosnek *et al.*, 2002). Auch eine direkte Übertragung von Mitteldarm zu den Speicheldrüsen wird in Betracht gezogen. Diese Übertragung findet immer dann statt, wenn der Mitteldarm weit nach vorn in den Thorax verlagert ist und physischen Kontakt zu den Speicheldrüsen herstellt (Cicero *et al.*, 1995; Cicero und Brown, 2011b). Durch die im Verlauf dieser Arbeit gemachten Erfahrungen beim Präparieren von Weiße Fliegen, lässt sich diese Vermutung nicht widerlegen. Aber ebenso wie es

Cicero und Brown postulierten, muss auch hier beachtet werden, dass Viruspartikel in der Hämolymphe quantifiziert wurden. Somit wird vor einer Passage der Viren durch die Hämolymphe ausgegangen, bei der der direkte Weg, vom Mitteldarm in die Speicheldrüsen durch physischen Kontakt, einen Sonderfall darstellt.

#### Vergleich der relativen Quantifizierung in Hämolymphe zur absoluten Quantifizierung in Mitteldärmen und Speicheldrüsen

Betrachtet man die Unterschiede zwischen den relativen Quantifizierungen von WmCSV und TYLCV, dann lässt sich für die Population 63 am Tag 6 ein  $\Delta\Delta C_q$ -Wert von -5,52 ermitteln. Nach der Formel  $2^{-\Delta\Delta C_q}$  ergibt sich ein Faktor von rund 45,89. Um diesen Faktor übersteigt der Gehalt an WmCSV-Genome in der Hämolymphe den Gehalt an TYLCV-Genome (Abb. 4.1). In Population 95 beträgt  $\Delta\Delta C_q$  den Wert -4,78, der Faktor beträgt 27,47 und in Population 95- beträgt  $\Delta\Delta C_q$  den Wert -4,64, der Faktor beträgt 24,93. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Faktoren, die für Mitteldärme festgestellt wurden (Population 63 / 95 / 95-; 158,69 / 998,46 / 15685,46; s. Tab. 6.5), entspricht jedoch grob dem Verhältnis, das für Speicheldrüsen ermittelt wurde (Population 63 / 95 / 95-; 10,23 / 77,83 / 12,50). Der Faktor in den Wirtspflanzen beträgt 11,73. Ursache für dieses Missverhältnis zwischen Mitteldarm und Hämolymphe / Speicheldrüsen ist die geringe TYLCV-Menge, die in der Lage ist den Mitteldarm von Population 95 und 95- zu passieren. Ein Beleg dafür, dass der Mitteldarm für TYLCV in Population 95 eine starke und in Population 95- eine sehr starke Barriere darstellt. In Abbildung 4.1 wurden die Mediane der Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Wirtspflanzen, Mitteldärmen und Speicheldrüsen an einer exponentiellen Skala aufgetragen. Da die Viren in der Hämolymphe nicht absolut quantifiziert werden konnten, war es nicht möglich einen scharf abgegrenzten Wert anzugeben. Mithilfe der  $C_q$ -Werte, die bei der Kombination von relativer und absoluter qPCR erhalten wurden, konnte jedoch die absolute Virusmenge in den unbestimmbaren Volumina errechnet werden. Für die Erstellung von Abbildung 4.1 wurde angenommen, dass bei einer Extraktion von Hämolymphe mindestens 10 % und maximal 100 % der gesamten im Organismus vorhandenen Hämolymphe extrahiert wurde. Bei einer 100%igen Extraktion entspricht die nach absoluter Quantifizierung erhaltene Virusmenge (x), die der gesamten Hämolymphe. Dieser Fall wird durch die untere Grenze der Boxen angegeben. Bei einer durchschnittlichen Extraktion von 10 % der Hämolymphe beträgt die tatsächlich in der Hämolymphe enthaltene Virusmenge 10x. Dieser Wert wird durch die obere Grenze der Boxen angegeben. Zu erkennen ist,

dass sich die Viruskonzentrationen in der Hämolymphe näher an den Konzentrationen in den Speicheldrüsen befinden, als an den Konzentrationen in Mitteldärmen.



**Abbildung 4.1: Mediane der Quantifizierung von WmCSV (blau) und TYLCV (rot) in Wirtspflanzen und Organen von *B. tabaci* Population 63, 95 und 95-.** Die Werte für Mitteldarm und Speicheldrüsen beziehen sich auf jeweils ein durchschnittliches Organ. Die senkrechten Linien symbolisieren die Barrieren innerhalb der Insekten. Die angegebenen Zahlenwerte beschreiben jeweils das Verhältnis zwischen den Medianen aus der WmCSV- und TYLCV-Quantifizierung. WP Wirtspflanze, MD Mitteldarm, Häm Hämolymphe, SD Speicheldrüse.

Die primären Speicheldrüsen stellen für WmCSV in Population 95- eine wesentliche Barriere dar

In primären Speicheldrüsen der Populationen 95 und 95- ließ sich TYLCV nur in sehr geringen Mengen quantifizieren und, ebenso wie in Mitteldärmen, nicht lokalisieren.



Nach gemeinsamer Betrachtung der Ergebnisse der Quantifizierung und Lokalisierung, ließ sich die zuvor getroffene Aussage bestätigen, dass für dieses Virus die äußere Membran des Mitteldarms bereits die wesentliche sehr starke Barriere darstellt.

Für WmCSV kommen in der Population 95-, neben der schwachen Barrierewirkung des Mitteldarms, noch die primären Speicheldrüsen als weitere Barrieren hinzu. Ersichtlich an der Differenz zwischen Gehalt in Hämolymphe und Speicheldrüse (Abb. 4.1). Im WmCSV-Nachweis wurde in 9 von 18 *real-time* Reaktionen, mit jeweils 10 vereinigten Speicheldrüsen, nur wenig Viren nachgewiesen, die restlichen 9 Reaktionen verliefen negativ. Somit wird geschlussfolgert, dass in der nicht übertragenden Population die Speicheldrüsen für WmCSV die ausschlaggebenden Barrieren sind. In einer unveröffentlichten Untersuchung konnte die Abgabe von WmCSV über das Stilet in Saccharoselösung, nur für virustragende Individuen der Population 63 nachgewiesen werden. Eine Injektion von WmCSV in Saccharoselösung, an der virustragende Individuen der Populationen 95 und 95-gesaugt hatten, war nicht möglich, was die Vermutung stützt, dass die Speicheldrüsen wesentliche Barrieren für WmCSV in diesen Populationen darstellen. Ob die Speicheldrüsen in der Subpopulation 95- eine absolute Barriere für WmCSV sind, kann aufgrund von Sensitivitätsgrenzen, die bei der Quantifizierung mit Saccharoselösung auftraten, nicht gesagt werden.

Das Verhältnis der lokalisierbaren Viren zwischen Mitteldarm und Speicheldrüsen in Population 63 lag für WmCSV / TYLCV bei 88,6 % / 94,7 % in Mitteldärmen, zu 72,8 % / 87,5 % in Speicheldrüsen. In der Population 95 war das Verhältnis von lokalisierten WmCSV in Mitteldarm (64,3 %) und Speicheldrüsen (66,7 %) annähernd gleich. Deutlich anders stellte sich der Nachweis des bipartiten SLCV dar. Ebenfalls mittels *in situ* Hybridisierung konnte SLCV in allen Mitteldärmen (100 %) der untersuchten virustragenden Individuen einer *B. tabaci* MEAM1 Laborpopulation aus Florida nachgewiesen werden, aber nur in 27 % der primären Speicheldrüsen (Cicero und Brown, 2011a, b). Ein Hinweis darauf, dass für jede Virusspezies und Vektorpopulation/-spezies individuelle Übertragungscharakteristika gelten. Nichtsdestotrotz gibt es aber auch Gemeinsamkeiten. So ist SLCV nicht in der Lage, vom Hämocoel aus, die Speicheldrüsen der Nicht-Vektor Weiße Fliege *Trialeurodes abutilonea* zu passieren (Cohen *et al.*, 1989). Ähnlich wie auch WmCSV nicht, bzw. nur in geringen Mengen, in der Lage ist, die Speicheldrüsen der Individuen von Population 95 und 95- zu überwinden. Im Kontrast dazu wurde SLCV weder in der Hämolymphe, noch im Speichel des Nicht-Vektors *Trialeurodes vaporariorum* gefunden (Rosell *et al.*, 1999). Zwei Mutanten des WmCSV mit jeweils einem einzigen Aminosäureaustausch an Position 131 bzw. 133 des Hüllproteins, werden generell nicht durch *B. tabaci*

übertragen. Die Mutante 133 wurde jedoch in den primären Speicheldrüsen nachgewiesen. Ebenso wurde beim TYLCSV allein durch Mutationen im Gen des Hüllproteins, dessen Transmission verhindert. Die Nicht-Übertragung wird in diesen Fällen auf die morphologische Veränderung der Virushülle und die damit fehlende spezifische Interaktionsmöglichkeit mit Rezeptoren in oder an den Speicheldrüsen, inklusive spezifischer Transportvorgänge, zurückgeführt (Kheyr-Pour *et al.*, 2000; Elwazzan, 2006; Medina *et al.*, 2006; Caciagli *et al.*, 2009; Cicero und Brown, 2011a). Ob es sich um die gleichen Rezeptoren bzw. Homologe derselben handelt, die zu der Nicht-Übertragung von Begomoviren durch die Population 95- führen, werden zukünftige Untersuchungen klären müssen.

Ähnlich wie WmCSV bei Population 63, 95 und 95- und TYLCV bei Population 63 in dieser Arbeit, ließen sich SLCV in der zentralen Region zwischen den Endkappen der Speicheldrüsen von *B. tabaci* MEAM1 aus Florida lokalisieren, in der nicht-gelartiger wässriger Speichel produziert wird. Es wird vermutet, dass der perizelluläre Raum, der sich um und zwischen den Endkappen befindet, den Weg markiert, den die Viren zum Erreichen der zentralen Region nehmen. Die Speichelbildung wird neben der Translokation vom Darm in die Hämolymphe, als der entscheidende Schritt in der zirkulativen Übertragung von Viren eingeschätzt (Cicero und Brown, 2011a). TYLCV Partikel wurden darüber hinaus auch in drei der Zellkerne der primären Speicheldrüsen einer gut übertragenden *B. tabaci* Population nachgewiesen. Eine mögliche Replikation der Viren in den Speicheldrüsen wird diskutiert (Czosnek *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur hier gemachten Lokalisierung, wurde das ToMoV in Individuen der kryptischen Art MEAM1 aus Florida eher in der Nähe der äußeren Membran der primären Speicheldrüsen in Spots lokalisiert (Hunter *et al.*, 1998).

In den akzessorischen Speicheldrüsen wurde SLCV nicht gefunden. Bei Aphiden wurde ermittelt, dass die Basallamina und die Plasmalemma der akzessorischen Speicheldrüsen spezifische Komponenten enthalten, die bei der Aufnahme ins Zytoplasma und bei der Übertragung von Luteoviren von Bedeutung sind. Die Rolle der akzessorischen Speicheldrüsen von *B. tabaci* bei der Übertragung von Begomoviren bleibt bisweilen ungeklärt (Peiffer *et al.*, 1997; Cicero und Brown, 2011a, b).

#### Identität der Population 95

Abbildung 4.1 verdeutlicht, dass die Werte der Population 95 überwiegend zwischen denen der gut übertragenden Population 63 und der nicht übertragenden Population 95- liegen. Da Population 95 eine schwach übertragende Population ist, aber beispielsweise relativ viele WmCSV-Partikel in der Hämolymphe nachgewiesen

wurden, kann vermutet werden, dass die primären Speicheldrüsen für einen Teil der Individuen die finale absolute Barriere für WmCSV darstellen. Bei einem kleineren Teil von Insekten (10 bis 20 %) stellen sie demnach jedoch keine absolute Barriere dar, wonach Population 95 als Mischpopulation beschrieben werden kann, aus der die Subpopulation 95- lediglich durch Selektion heraus sortiert wurde. Die primären Speicheldrüsen der Population 95- würden somit die finale absolute Barriere für WmCSV darstellen. Die Beobachtung, dass WmCSV durch die *real-time* Experimente in vereinigten Speicheldrüsen der Subpopulation 95- nachgewiesen wurden, deutet darauf hin, dass entweder die inneren Membranen der Speicheldrüsen, die eine Grenze zwischen Drüsengewebe und Speichelkanal bilden, die finale Barriere für die Viren darstellen oder die äußere Membran, an der die Viren binden ohne anschließend durch die Membran weitertransportiert zu werden. Für die inneren Membranen als die entscheidenden Barrieren sprechen die Beobachtungen, die mit der bereits erwähnten Nicht-Übertragung der WmCSV Mutante 133 gemacht wurden (Elwazzan, 2006), sowie die Beobachtungen, die mit zwei nicht übertragbaren Mutanten des TYLCSV gemacht wurden. Mutanten und übertragbarer Wildtyp wurden innerhalb der primären Speicheldrüsen einer *B. tabaci* MEAM1 Population aus Italien nachgewiesen. Vermutet wird eine fehlende Interaktion zwischen dem veränderten Hüllprotein der TYLCSV Mutante und einem bisher unbekannten Weiße Fliege-Rezeptor bzw. eine Blockierung des Rezeptors innerhalb der Speicheldrüsen, die diese als wesentliche Barriere auszeichnen und die einen Weitertransport in den Speichel verhindern (Caciagli *et al.*, 2009). Ob bei der fehlenden Übertragungsfähigkeit der Population 95-, der gleiche Rezeptor involviert bzw. nicht involviert ist, müssen zukünftige Untersuchungen klären. Die Ergebnisse der Quantifizierung mit Speicheldrüsen der Population 95- unterstützen noch eine weitere These. Nach dieser zweiten These wird diskutiert, dass die Speicheldrüsen der Populationen 95 und 95- generell einen Teil der Viren passieren lassen. Hiernach stellen die Speicheldrüsen, so wie in dieser Arbeit für die Mitteldärme erarbeitet, nur Teilbarrieren für WmCSV in Population 95 und 95- dar. Eine Infektion der Wirtspflanzen hängt dann davon ab, wie hoch der Virustiter im Speichel ist, der bei den Wirtspflanzen ankommt. Im Falle der Population 95- reicht die Menge an WmCSV-Partikel, die die Speicheldrüsen passiert nicht aus, um einem Ausbruch der Krankheit zu verursachen. Denn es muss eine gewisse Mindestanzahl an Viren vorhanden sein, um eine Wirtspflanze systemisch erkranken zu lassen (Caciagli *et al.*, 2009). Vom Geminivirus *Wheat dwarf virus* (WDV, Gattung *Mastrevirus*) weiß man, dass ein Großteil der in Weizenzellen eingeschleusten viralen DNA, sofort vom Wirt abgebaut wird (Suárez-López und Gutiérrez, 1997). Wie hoch die Mindestanzahl an WmCSV und TYLCV-Partikeln für eine Infektion von Wassermelonen bzw. Tomaten

sein muss, ist bisher nicht bekannt. Da aber selbst Gruppen von ca. 300 virustragenden Individuen der Population 95- bei einer IAP von mindestens 7 Tagen, 15 junge Wassermelonen bzw. Tomaten nicht zu infizieren vermochten und die Pflanzen über den gesamten Beobachtungszeitraum von mehreren Wochen symptomlos blieben, muss der hypothetische Virusgehalt, der die Speicheldrüsen passiert, sehr gering sein. Von Wassermelonen und anderen Kürbisgewächsen weiß man, dass sie nur dann Symptome einer Infektion des Geminivirus *Beet mild curly top virus* (BMCTV, Gattung *Curtovirus*) zeigen, wenn der Virustiter in den Wirtspflanzen, der durch Zikaden (*Circulifer tenellus* Baker) übertragenen Viren, zum Zeitpunkt der AAP hoch war. Die Pflanzen blieben symptomlos, wenn die Zikaden von Wirten mit schwachen Symptomen und niedrigem Virustiter übertrugen (Chen und Gilbertson, 2009).

Nach der zweiten hier vorgestellten These handelt es sich bei Population 95 um keine Mischpopulation, sondern um eine Population mit einem gewissen Spektrum an Übertragungsfähigkeit bzw. Durchlässigkeit der Gewebe für Begomoviren, aus der die Population 95- heraus gezüchtet wurde. Gegen diese zweite These spricht die Beobachtung, dass der Virusgehalt auch in der Hämolymphe der Population 95- relativ hoch ist und in der untersuchten Saccharoselösung, von der sich die virustragenden Insekten 48 Stunden ernähren konnten, unter Beachtung der Sensitivität des Versuchs, keinerlei Viren nachgewiesen wurden. Für die zweite Theorie spricht die Beobachtung, dass es im Anschluss an diese Arbeit in Versuchen zur Selektion einer gut übertragenden Subpopulation aus der Population 95, lediglich gelang, eine Subpopulation (95+) zu erhalten, die eine Übertragungsrate von lediglich ca. 50 Prozent aufweist (persönliche Mitteilung Monika Götz). Dies spricht für eine Population 95, die ein Spektrum an Übertragungsraten (0 % bis ca. 50 %) besitzt, aus der die Populationen 95- und 95+ gezüchtet werden konnten.

#### **4.8 Nach Isolation von infizierten Wirtspflanzen, nimmt der Virusgehalt von *B. tabaci* über einen Zeitraum von 10 Tagen kaum ab**

In dieser Arbeit wurde der Virusgehalt in Mitteldärmen über einen Zeitraum von 10 Tagen beobachtet, nachdem die Weiße Fliegen von infizierten Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen transferiert wurden. Bei den untersuchten Mitteldärmen der drei Populationen 63, 95 und 95-, blieben die quantifizierten Virusmengen, unter Berücksichtigung der Dekontamination des Darmlumens, über den gesamten Zeitraum relativ konstant. Gleiches gilt für die Hämolymphe. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Resultaten, die mittels quantitativer Chemilumineszenz-Punkt-Blot

Analyse erhalten wurden. In einer *B. tabaci* MEAM1 Population aus Sardinien, nahm der TYLCSV-Gehalt über 36 Stunden ebenfalls nur sehr langsam ab, nachdem die Insekten von infizierten Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen überführt wurden (Caciagli und Bosco, 1997). Rubinstein und Czosnek (1997) inkubierten 24 Stunden alte *B. tabaci* aus Israel für eine AAP von 48 Stunden auf TYLCV infizierten Pflanzen und transferierten sie anschließend für den Rest ihres Lebens auf Auberginen. Die Hüllproteine von TYLCV waren nach 12 Tagen nicht mehr nachweisbar, die DNA von TYLCV wurde jedoch über die gesamte Lebensspanne der adulten Tiere nachgewiesen. Die Fähigkeit TYLCV auf Wirtspflanzen zu übertragen sank zwar mit zunehmendem Alter, blieb aber ein Leben lang beständig. Auch das bipartite SLCV blieb ein Leben lang in Individuen von *B. tabaci* nachweisbar (Cohen *et al.* 1989). Dies deckt sich mit den Ergebnissen die für die Populationen 63, 95 und 95- mit WmCSV gemacht wurden, bei denen der Gehalt an Virus-DNA über einen Zeitraum von 10 Tagen nur minimal abnahm.

In einem Übertragungsversuch von WmCSV in Saccharoselösung wurde festgestellt, dass 100 virustragende Weiße Fliegen der Population 63 in 48 Stunden rund  $6 \times 10^4$  WmCSV-Genome auf 300  $\mu$ l Saccharoselösung übertragen (nicht gezeigt). Bei der Annahme, dass die Weiße Fliegen auch nach Transfer auf Nicht-Wirtspflanzen kontinuierlich diese Virusmenge weiter über das Stilett abgeben, würden 100 Insekten in 10 Tagen rund  $3 \times 10^5$  WmCSV-Genome transmittieren. Ein Individuum somit rund  $3 \times 10^3$  Viren. Dieser Wert ist verschwindend gering, zu dem durchschnittlichen WmCSV-Gehalt je Mitteldarm von  $6,2 \times 10^6$  Genome. Die Virusabgabe über das Stilett macht sich somit, bei der Virusquantifizierung in Organen oder ganzen Individuen, selbst über einen längeren Zeitraum, kaum bemerkbar. Ein durchschnittlicher Mitteldarm von Population 63 enthält auch drei Wochen nach Transfer, von einer infizierten symptomatischen Wassermelonpflanze auf eine Nicht-Wirtspflanze, noch rund  $2,6 \times 10^5$  Virusgenome, was im Einklang mit der geringen Abgabe über das Stilett steht. Ebenso im Einklang steht die Beobachtung von Ghanim *et al.* (2000), dass in Individuen die an Saccharoselösung saugten, an der zuvor für 48 Stunden virustragende Weiße Fliegen gesaugt hatten, keine Viren nachgewiesen werden konnten.

#### 4.9 Begomoviren lassen sich in Nachkommen von virustragenden *B. tabaci* nachweisen

In Nachkommen der drei *B. tabaci* Populationen, wurde die DNA von WmCSV und TYLCV ebenfalls nachgewiesen. Je höher der Virusgehalt in den jeweiligen Elterngenerationen ist, desto geringer ist der prozentuale Anteil in den Nachkommen (s. Tab. 3.3). Bei einer ungehinderten Diffusion der Viren zu den Eiern, wäre das prozentuale Verhältnis in allen drei Populationen gleich. Da dem aber nicht so ist, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass es sich hierbei um aktive oder passive Transportvorgänge handelt, die eine spezifische Transferrate aufweisen. Bereits 1996 haben Costa *et al.* in Individuen der kryptischen Art *B. tabaci* *New World* aus den USA, die von Pflanzen der Gattung *Jatropha* gesammelt wurden, virusähnliche ikosaedrale Partikel mit durchschnittlich 30 nm Länge gefunden, die verstreut im Zytoplasma der Bakteriozyten der bakteriellen Endosymbionten lagen und deren transovariale Weitergabe vermutet wurde. Zwei Jahre später wurde die transovariale Weitergabe von TYLCV an die Nachkommen einer MEAM1 Population aus Israel nachgewiesen. Eine Infektion von Wirtspflanzen mit TYLCV durch Nachkommen dieser Population war ebenfalls möglich (Ghanim *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu war eine Infektion von Wirtspflanzen mit Nachkommen virustragender Individuen der Populationen 63, 95 und 95- dieser Arbeit nicht möglich. Bosco *et al.* (2004) haben für *B. tabaci* Populationen der Arten MEAM1 und *Mediterranean* aus Italien den Nachweis für eine transovariale Übertragung von TYLCV und TYLCSV veröffentlicht. In Eiern, Nymphen, sowie in adulten Nachkommen einer virustragenden ersten Generation wurden jeweils beide Viren nachgewiesen. Im Gegensatz dazu und zu den Ergebnissen dieser Arbeit, konnten Pan *et al.* (2012a) TYLCV ausschließlich in den Eiern und Larvenstadien von MEAM1 und *Mediterranean* Populationen aus China nachweisen. In Puppen und adulten Nachkommen, von virustragenden *B. tabaci* aus China, wurde TYLCV nicht gefunden.

Die Beobachtungen dieser Arbeit und die angeführten Ergebnisse anderer Arbeiten führen zu der Schlussfolgerung, dass die Übertragung von Elterngeneration zu den Nachkommen, für unterschiedliche Arten, sowie Populationen, individuellen Prozessen folgen. Ähnlich wie auch die Übertragung bzw. Nicht-Übertragung von Begomoviren zu den Wirtspflanzen für jedes Virus und jede Weiße Fliege Population individuell ist.

#### 4.10 Interaktion der viralen Hüllproteine mit Hsp70, jedoch keine Förderung der Übertragung

Bei der Übertragung von Begomoviren durch *B. tabaci* interagieren die Hüllproteine mit Proteinen der Weiße Fliege. Neben der zuvor erwähnten Interaktion mit dem Chaperon GroEL, ist auch bereits eine Interaktion zwischen kleinen Hitzeschock-Proteinen (BtHsp16) der *B. tabaci* Art *Mediterranean* und dem Hüllproteinen des TYLCSV nachgewiesen worden. Eine Beteiligung an der Übertragung der Begomoviren, durch eine stabilisierende Chaperon-Wirkung und durch einen Schutz vor Zusammenballung und Abbau in Darm und Hämolymphe, wird diskutiert (Ohnesorge und Bejarano, 2009). Sowie ein Ermöglichen des Passierens von Zellmembranen, da man beispielsweise von kleineren Hitzeschock-Proteinen weiß, dass sie die Fließeigenschaften von Membranen regulieren können (Tsvetkova *et al.*, 2002).

Mittels VOPBA wurde *in vitro* die Interaktion zwischen aufgereinigten Virionen von TYLCV und dem Hsp70 von *B. tabaci* MEAM1 nachgewiesen (Götz *et al.*, 2012). In dieser Arbeit wurde in Mitteldärmen der Population 63 mittels FISH eine Ko-Lokalisierung von WmCSV bzw. TYLCV mit Hsp70 nachgewiesen. Bei Individuen der Population 95 und 95- wurde eine Ko-Lokalisierung nicht bestätigt. Dies unterstützt zunächst die Hypothese, dass die Interaktion zwischen Hsp70 und WmCSV bzw. TYLCV für die Virusübertragung erforderlich ist. Bei den Populationen 95 und 95- wurden keine derartigen Interaktionen gefunden, was die schwache bzw. fehlende Virusübertragung begründen könnte.

Closteroviren wie das *Tomato infectious chlorosis virus* (TICV), das *Cucurbit yellow stunting disorder virus* (CYSDV) und das *Beet yellows closterovirus* (BYV), welche ebenfalls durch Insektenvektoren übertragen werden, enthalten in ihrem Genom *hsp70* Homologe, deren Genprodukte eine Rolle als *movement*-Proteine innerhalb der Wirtspflanzen spielen (Agranovsky *et al.*, 1998; Peremyslov *et al.*, 1999; Ruiz *et al.*, 2002; Orílio und Navas-Castillo, 2009). Das Hsp70 Homolog des *Crinivirus* (*Closteroviridae*) *Lettuce infectious yellows virus* (LIYV) wurde *in vitro* in einer Immunoblot-Analyse gemeinsam mit LIYV nachgewiesen. Die Fütterung eines Hsp70 Homolog Antiserums reduzierte die Übertragung von LIYV jedoch nur gering (Tian *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu, steigerte in dieser Arbeit die Fütterung eines anti-Hsp70 Antikörpers an die Population 63 die Transmissionsrate von TYLCV um 25,5 %. Die Hypothese, dass ein Blockieren der Hsp70 Proteine zu einer Verringerung der Übertragungsfähigkeit führt, wurde damit widerlegt und kann zusätzlich durch die Aussage ersetzt werden, dass ein Blockieren der Hsp70 Proteine zu einer Erhöhung der Übertragungsrate führt. Eine mögliche Erklärung ist, dass zwar in den Zellen von

*B. tabaci* Hsp70 Moleküle mit Begomoviren interagieren, aber damit die Viren auf ihrem Weg durch die Weiße Fliege eher behindern, als fördern. Wird Hsp70 durch Antikörper blockiert, wird somit die Behinderung der Viren unterbunden. Als Folge übertragen die mit anti-Hsp70 Antikörper gefütterten Insekten die Begomoviren effizienter und mehr Pflanzen werden symptomatisch. Hsp70 spielt demnach, trotz Interaktion mit den Begomoviren, keine essenzielle Rolle bei der Übertragung der Begomoviren durch *B. tabaci*. Mit dieser Überlegung steht auch die Beobachtung im Einklang, dass eine Fütterung von anti-Hsp70 Antikörpern keinen ersichtlichen Einfluss auf die Nicht-Übertragung der Population 95- hatte. Obwohl auch hier die Möglichkeit geschaffen war, dass Hsp70 Moleküle von Antikörpern blockiert werden konnten, wurde eine Fähigkeit zur Virusübertragung damit nicht hergestellt. Somit müssen die Ursachen für die nicht vorhandene Übertragungsfähigkeit der Population 95- an anderer Stelle begründet sein.

Bevor dieser Versuch durchgeführt werden konnte, musste bestätigt werden, dass die Antikörper, die eine Größe von ca. 15 nm besitzen (Alberts *et al.*, 2004), *in vivo* unverdaut in die Zellen des Mitteldarms von *B. tabaci* aufgenommen werden (s. Punkt 3.8.4). Bereits 1991 wurden Immunglobuline des Wirtes der Büffelfliege *Haematobia irritans exigua* (Diptera, Muscidae) unverdaut in deren Hämolymphe nachgewiesen (Allingham *et al.* 1992). Casartelli *et al.* (2005, 2008) zeigten, dass *in vitro* Mitteldarmzellen der Seidenraupe *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae) FITC-markiertes Albumin unverdaut aufnehmen und mittels Transzytose in die Hämolymphe dieser Insekten transportieren können. Rosell *et al.* (2003) haben nachgewiesen, dass gefütterte FITC-markierte Polysaccharide, in der Größe von 20 nm, ebenfalls unverdaut in die Filterkammer und den vorderen Teil des Mitteldarms von *B. tabaci* aufgenommen werden.

Ein Vergleich der Übertragungsrate der Population 63, nach Fütterung von TYLCV, im Anschluss an die Fütterung von Präimmunserum, mit der Übertragungsrate nach Virusaufnahme von infizierten Wirtspflanzen zeigte, dass die Übertragungsrate der Population 63 in der Präimmunserumkontrolle geringer war. Dies kann erstens auf die kurze Kontaktzeit mit dem Nährmedium (AAP) zurückgeführt werden. Zweitens ist bekannt, dass nach künstlicher Fütterung von Viren die Übertragungsraten der Vektoren verändert sein können (Thottappilly *et al.*, 1972; Froissart *et al.*, 2010). Drittens wurde in diesem Versuch den Weiße Fliegen eine definierte Konzentration an Virus über das Nährmedium zur Verfügung gestellt. Da das Nährmedium direkt in die qPCR eingeführt wurde, entspricht der quantifizierte Virusgehalt exakt dem tatsächlich im Nährmedium enthaltenen ( $3,3 \times 10^7$  Virusgenome/100 ng Nährlösung). In 100 ng DNA aus symptomatischen Tomaten sind ca.  $5,9 \times 10^7$  Virusgenome nachweisbar (s.



Tab. 6.3). Der tatsächlich von den Weiße Fliegen zugängliche Virusgehalt liegt über dem Wert der Quantifizierung, zum einen, da TYLCV phloemlimitiert ist und zum anderen, da bei der DNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial die virale DNA niemals vollständig aufgereinigt werden kann.

Neben der Lokalisierung, wurde in dieser Arbeit auch die relative Expression von *hsp70* untersucht. In Individuen von *B. tabaci* der Populationen 63, 95 und 95-, die WmCSV aufgenommen hatten, war die *hsp70* Expression erhöht. Ebenso in Individuen der Population 63, die TYLCV-tragend waren. In Weiße Fliegen der Population 95, die TYLCV aufgenommen hatten, stieg die relative *hsp70* Expression weniger stark an, was als Bestätigung für die Barrierewirkung des Mitteldarms dieser Population gewertet werden kann. Bei Zelllinien der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde ebenfalls eine Aktivierung der Promotoren von *hsp70* Genen festgestellt, nachdem diese mit einem insektenpathogenen Baculovirus infiziert wurden (Crouch und Passarelli, 2005).

Da das Hsp70, wie in dieser Arbeit ermittelt, nicht fördernd an der Übertragung der Begomoviren WmCSV und TYLCV durch *B. tabaci* beteiligt ist, wird angenommen, dass die *hsp70* Expressionserhöhung eine spezifische Stressreaktion zur Abwehr von Fremdkörpern darstellt oder die Zellen versuchen den Verlust an blockierten Hsp70 Proteinen auszugleichen. Von einem spezifischen Prozess wird ausgegangen, da die *hsp70* Expression durch das nicht übertragbare FBNSV, das ebenfalls in den Mitteldarm eindringen kann, nicht beeinflusst wird. Eine Interaktion von Nanoviren mit Hitzeschockproteinen von Aphiden wurde bisweilen nicht gefunden. Eine erhöhte Abwehr gegen Stressoren durch Hsp70, wird auch bei TYLCV-resistenten Tomaten diskutiert, bei denen nach Injektion von TYLCV durch *B. tabaci*, die Proteinmenge an Hsp70, im Gegensatz zu anfälligen Sorten, nicht herunter reguliert ist (Gorovits *et al.*, 2007; Gorovits und Czosnek, 2008).

TYLCV tragende *B. tabaci* MEAM1 haben eine geringere Lebenserwartung als virusfreie Individuen der gleichen kryptischen Art. Die verringerte Lebenserwartung wird in Zusammenhang mit einem erhöhten Umsatz des Metabolismus gesehen. Die virustragenden Weiße Fliegen sind darüber hinaus weniger tolerant gegen Hitzestress, als jene, die keine Viren aufgenommen haben, trotz einer Erhöhung der Expression von Hitzeschockproteinen (Pusag *et al.*, 2012). Inwiefern ein Zusammenhang besteht, zwischen der geringeren Stresstoleranz und der möglichen Blockierung von Hsp70 durch die Viren, bleibt zu klären.

## 5 Zusammenfassung

Die Begomoviren *Watermelon chlorotic stunt virus* (WmCSV) und *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) verursachen große Ernteverluste an Wassermelonen und Tomaten, vorwiegend in tropischen und subtropischen Regionen der Erde. Übertragen werden diese Pflanzenviren durch die Weiße Fliege *Bemisia tabaci*, welche sich polyphag vom Phloemsaft ihrer Wirtspflanzen ernährt und die Viren zirkulativ persistent weitergibt.

In dieser Arbeit wurden zwei *B. tabaci* Populationen aus dem Sudan untersucht, die unterschiedliche Übertragungsraten für Begomoviren aufweisen: zum einen die *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1) Population 63, mit hoher Übertragungsrate und zum anderen die MEAM1 Population 95, mit geringer Übertragungsrate. Bei der zirkulativen Übertragung müssen die Viren mehrere Barrieren innerhalb der Weiße Fliegen überwinden. Dabei handelt es sich um die Membranen des Mitteldarms, die Hämolymphe, die im Hämocoel zirkuliert und die Membranen der Speicheldrüsen. In dieser Arbeit wurden, zum ersten Mal für die gut und schwach übertragenden Populationen 63 und 95, die aufgenommenen Viren mittels *real-time* PCR quantifiziert, ihre Aufnahmezeit bestimmt und mittels Konfokalmikroskopie in Mitteldärmen und primären Speicheldrüsen lokalisiert. Zusätzlich wurde im Verlauf dieser Arbeit aus der schwach übertragenden Population 95 eine nicht übertragende Subpopulation (95-) selektiert. Die Ergebnisse der Untersuchung der Population 95- und der Vergleich mit Population 63 legen nahe, dass in den Individuen der Populationen 95 und 95- die äußeren Membranen des Mitteldarms für TYLCV eine wesentliche Barriere darstellen. Für WmCSV sind die Mitteldärme der schwach und nicht übertragenden Populationen ebenfalls eine Barriere, die jedoch von einem Teil der Viren überwunden wird. Erst die primären Speicheldrüsen stellen bei diesen Individuen die finalen Barrieren für WmCSV dar.

Nach zusätzlichem Vergleich mit Quantifizierungsdaten des Nanovirus *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV), wurde festgestellt, dass die nicht-Übertragbarkeit von Begomoviren durch die Population 95-, bzw. die generelle nicht-Übertragbarkeit von FBNSV durch *B. tabaci*, für jedes Virus individuelle Ursachen hat.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Interaktion von WmCSV und TYLCV mit dem Weiße Fliege Hitzeschockprotein Hsp70 untersucht, welches in den Fokus geraten war, bei der Begomovirus-Übertragung involviert zu sein. Eine erhöhte Expression von *hsp70* in virustragenden Individuen, sowie eine Ko-Lokalisierung von WmCSV bzw. TYLCV mit Hsp70 wurde beobachtet. Eine unterstützende Funktion bei der Virusübertragung konnte jedoch widerlegt werden.

## Abstract

The Begomovirus Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) and Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) causes huge yield losses in watermelons and tomatoes, respectively, mainly in tropical and subtropical regions of the world. These viruses are transmitted by the whitefly *Bemisia tabaci*, which is polyphagous feeding on the phloem juice of their host plants and transmitting viruses in a circulative persistent manner.

In this study two *B. tabaci* populations from Sudan differing in Begomovirus transmission rates were analyzed. The *Middle East-Asia Minor 1* (MEAM1) population 63 has a high transmission rate and the second MEAM1 population (95) has a low transmission rate. During circulative transmission viruses have to pass through several barriers in the whitefly. These include the membranes of the midgut, the hemolymph, which circulates in the hemocoel and the membranes of the salivary glands. In this study for the first time, the uptake of the virus and the quantity of the virus inside the good and low transmitting populations were quantified by real-time PCR. Using confocal microscopy, both viruses were seen localized in midguts and salivary glands. Additionally, a non-transmitting subpopulation (95-) was selected from the low transmitting population 95 and analyzed. The results were compared with those of the better transmitting population 63. The results indicate that the outer membrane of the midgut is an effective barrier for TYLCV in the individual of populations of 95 and 95-. For WmCSV the midguts of the low and non-transmitting populations are also barriers that can be crossed by some of these viruses. In these individuals the primary salivary glands are the final barrier for WmCSV.

However, a comparison with the quantification data from the Nanovirus *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV) shows that the non-transmissibility of plant viruses by *B. tabaci* populations could be due to the fact that each individual virus has its own reason for not being transmitted.

Several whitefly proteins are thought to be involved in the transmission of Begomoviruses. In this study the interaction of WmCSV and TYLCV with the heat shock protein Hsp70 was analyzed. An enhanced expression of *hsp70* and a co-localization between WmCSV and TYLCV with Hsp70 in virus bearing individuals was observed. It was found that this protein acted against virus transmission.

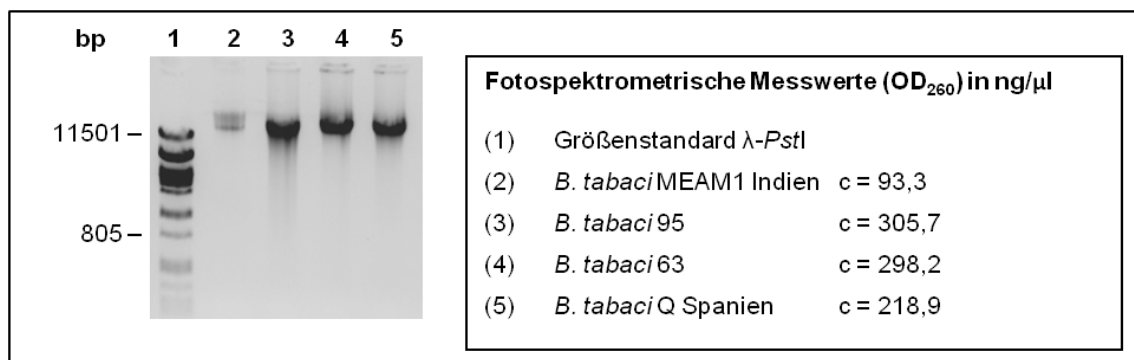
## 6 Anhang

### 6.1 Nukleinsäure-Extraktion aus Weiße Fliegen und Wirtspflanzen

Unter den Punkten 6.1.1 bis 6.1.7 werden einige der Ergebnisse, der in dieser Arbeit verwendeten Nukleinsäure-Extraktionen präsentiert. Da es bei der Vielzahl an durchgeführten Quantifizierungen ungünstig wäre, kontinuierlich sämtliche DNA und RNA-Extraktionen aufzuführen, werden hier lediglich zu jeder Methode einige wenige Resultate vorgestellt.

#### 6.1.1 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen nach Protokoll von Shahjahan *et al.*, (1995)

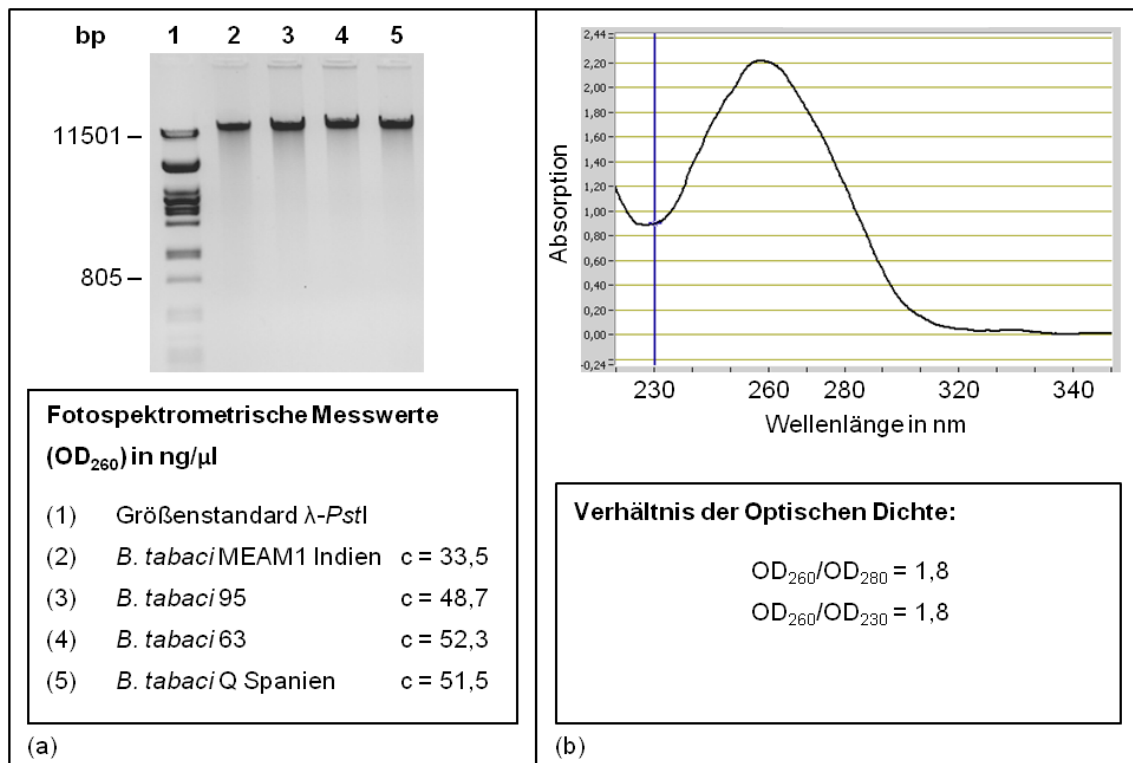
Die DNA-Aufreinigung nach Shahjahan *et al.* (1995) ist eine, auf den Eigenschaften von CTAB basierende, schnelle Methode zur Nukleinsäure-Aufreinigung aus Insekten. Aus 100 Individuen *B. tabaci* ließen sich ca. 11500 ng DNA isolieren [230 ng/µl]. Dies entspricht etwa 115 ng pro Individuum (Abb. 6.1). Oftmals ist die DNA mit viel Protein und RNA verunreinigt und der Gehalt an DNA relativ gering. Der hohe Anteil an RNA verfälscht die Konzentrationsmessung bei 260 nm Wellenlänge des Lichts. Diese DNA war daher nicht für quantitative *real-time* PCR Experimente geeignet. Sehr wohl aber für herkömmliche PCR, wo lediglich eine Ja-/Nein-Antwort erwartet wurde.



**Abbildung 6.1: Elektrophoretische Darstellung von DNA in Anschluss an eine Extraktion aus 100 Individuen nach Shahjahan *et al.*, 1995.** Dargestellt ist ein Foto, eines 1%igen Agarosegels, welches mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht aufgenommen wurde. Zu erkennen sind der Größenstandard  $\lambda$ -PstI (mit linksseitig angegebener Basenpaarlänge zweier Banden), sowie vier DNA-Banden, entsprechend der vier *B. tabaci* Populationen. Die DNA wurde aus 100 Individuen nach Shahjahan *et al.*, 1995 extrahiert und befand sich in einem Volumen von 50 µl. Jeweils 5 µl der extrahierten DNA wurden auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Konzentration [c] der jeweiligen Extraktionen wurde mittels Fotospektrometer (NanoDrop) bestimmt und ist in ng/µl angegeben.

### 6.1.2 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN)

Die DNA der Weiße Fliegen, samt ihrer Endosymbionten und Viren, wurde für anschließende quantitative *real-time* Reaktionen mittels eines Protokolls isoliert, welches offiziell für Pflanzenmaterial verfasst wurde. Dies wirkte sich auf die Extraktion jedoch nicht nachteilig aus.



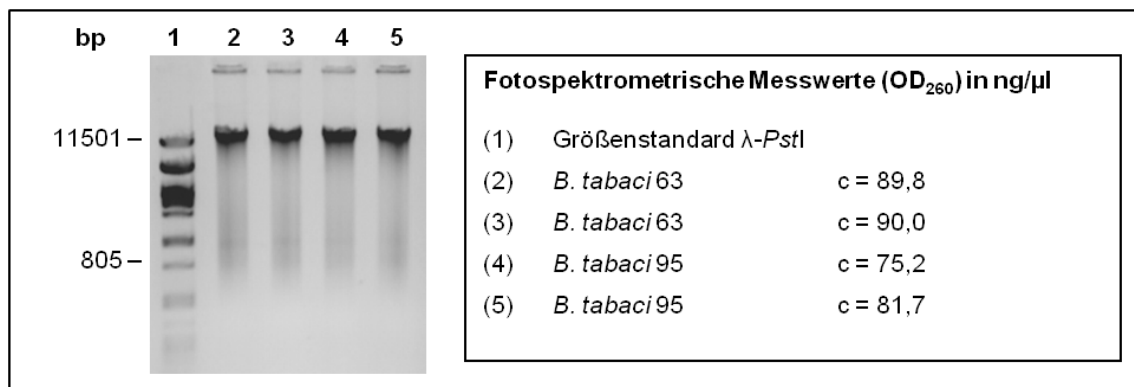
**Abbildung 6.2: Elektrophoretische Darstellung von DNA-Extrakten aus *B. tabaci* und Absorptionsmessung am NanoDrop.** (a) Dargestellt ist ein Foto, eines 1%igen Agarosegels, welches mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht aufgenommen wurde. Zu erkennen sind der Größenstandard λ-*Pst*I (mit linksseitig angegebener Basenpaarlänge zweier Banden), sowie vier DNA-Banden, entsprechend der vier *B. tabaci* Populationen. Die DNA wurde aus 100 Individuen mittels *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) extrahiert und befand sich in einem Volumen von 100 μl. Jeweils 5 μl der extrahierten DNA wurden auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Konzentration [c] der jeweiligen Extraktionen wurde mittels Fotospektrometer (NanoDrop) bestimmt und ist in ng/μl angegeben. (b) Graphische Darstellung der Absorptionsmessung einer extrahierten Gesamt-DNA aus *B. tabaci* Population 95.

Aus 100 vereinten Individuen von *B. tabaci* ließen sich durchschnittlich ca. 5000 ng DNA isolieren [50 ng/μl]. Das entspricht etwa 50 ng DNA pro Individuum (Abb. 6.2a). Kontaminationen mit Proteinen und RNA traten hier kaum auf, was durch das Verhältnis von rund 1,8 zwischen der Absorptionsmessung von UV-Licht bei 260 nm und 280 nm zum Ausdruck kommt (Abb. 6.2b). Der Idealwert für reine DNA liegt ebenfalls bei 1,8. Das Verhältnis der Optischen Dichte von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>230</sub>, spiegelt die

Verunreinigung durch Salze und unerwünschte organische Moleküle wieder und entspricht mit durchschnittlich 1,8 ebenfalls dem Idealwert für reine DNA.

### 6.1.3 DNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels *High Pure Template Preparation Kit* (Roche)

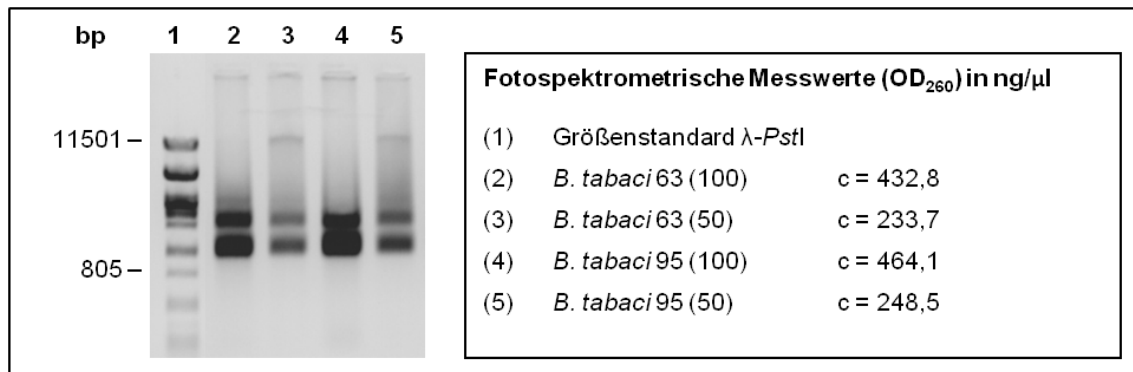
Die durchschnittliche DNA-Menge, die mit dieser Methode aus einem Individuum extrahiert wurde, entspricht durchschnittlich rund 56 ng (Abb. 6.3). Die DNA-Ausbeute war somit ähnlich zu jener, welche mittels *DNeasy Plant Mini Kit* erhalten wurde.



**Abbildung 6.3: Elektrophoretische Darstellung von DNA-Extrakten aus jeweils 100 *B. tabaci* mittels *High Pure Template Preparation Kit* (Roche).** Dargestellt ist ein Foto, eines 1%igen Agarosegels, welches mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht aufgenommen wurde. Zu erkennen sind unter (1) der DNA-Größenstandard λ-*Pst*I (mit linksseitig angegebener Basenpaarlänge zweier Banden), sowie je zwei parallel extrahierte DNA aus den *B. tabaci* Populationen 63 und 95. Jeweils 5 μl der extrahierten DNA wurden auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Konzentration [c] der jeweiligen Extraktionen wurde mittels Fotospektrometer (NanoDrop) bestimmt und ist in ng/μl angegeben.

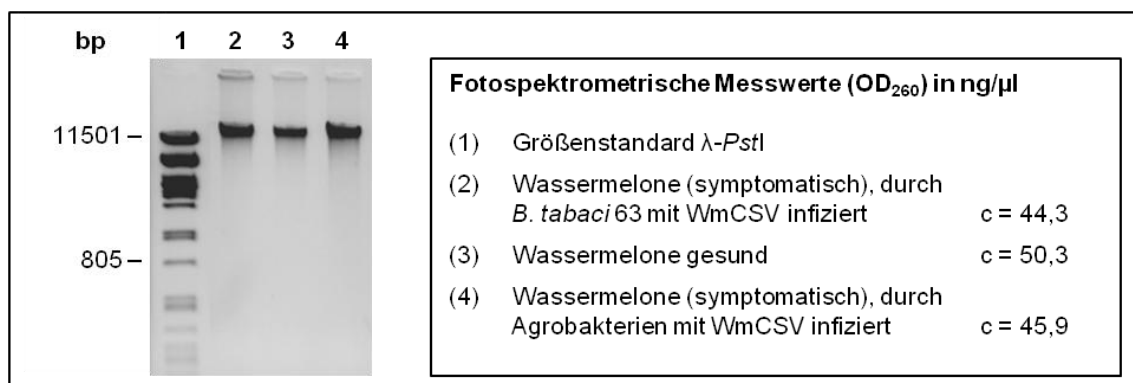
### 6.1.4 RNA-Extraktion aus Weiße Fliegen mittels *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN)

RNA wurde aus Weiße Fliegen ebenfalls nach einem Protokoll, welches für Pflanzenmaterial ausgezeichnet ist, extrahiert (Abb. 6.4). Die unterschiedlichen Banden im Gelfoto spiegeln die an der Gesamt-RNA mengenmäßig überlegenen ribosomalen RNA-Moleküle wieder.



**Abbildung 6.4: Elektrophoretische Darstellung von RNA Extrakten aus *B. tabaci* mittels *RNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN).** Dargestellt ist ein Foto, eines 1%igen Agarosegels, welches mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht aufgenommen wurde. Zu erkennen sind unter (1) der DNA-Größenstandard λ-PstI (mit linksseitig angegebener Basenpaarlänge zweier Banden), sowie zwei RNA-Banden je Extraktion, welche die großen RNA-Moleküle der Ribosomen beinhalten. Die RNA wurde in (2) und (4) aus 100 Individuen mittels *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) extrahiert, in (3) und (5) aus je 50 Individuen. Jeweils 5 μl der extrahierten DNA wurden auf das Gel aufgetragen. Die RNA-Konzentration [c] der jeweiligen Extraktionen wurde mittels Fotospektrometer (NanoDrop) bestimmt und ist in ng/μl angegeben.

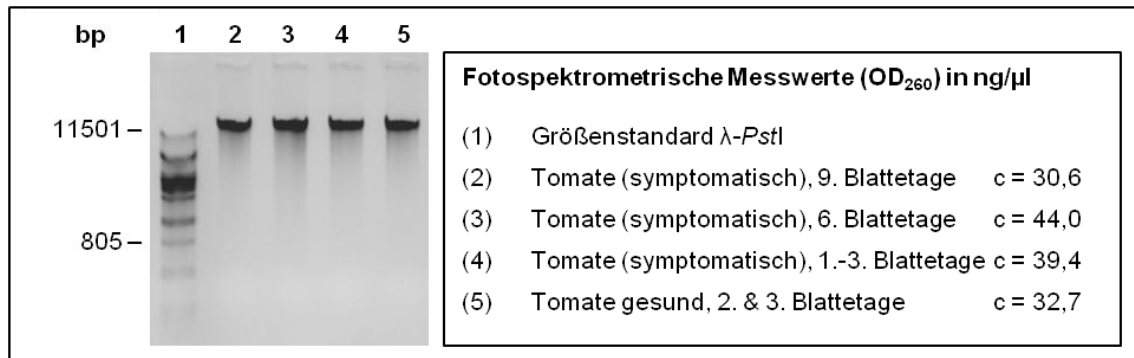
#### 6.1.5 DNA-Extraktion aus Wirtspflanzen nach Dellaporta und *DNeasy* (QIAGEN)



**Abbildung 6.5: Elektrophoretische Darstellung von DNA-Extrakten aus Wassermelonenblätter mittels *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland).** Dargestellt ist ein Foto, eines 1%igen Agarosegels, welches mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht aufgenommen wurde. Zu erkennen sind unter (1) der DNA-Größenstandard λ-PstI (mit linksseitig angegebener Basenpaarlänge zweier Banden), sowie unter (2), (3) und (4) drei parallel extrahierte DNA aus Wassermelonenlaubblättern. Die Extrakte (2) und (4) wurden von symptomatischen WmCSV infizierten Wassermelonen gewonnen. Extrakt (3) wurde aus einem Blatt einer gesunden Wassermelone hergestellt. Jeweils 5 μl der extrahierten DNA wurden auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Konzentration [c] der jeweiligen Extraktionen wurde mittels Fotospektrometer (NanoDrop) bestimmt und ist in ng/μl angegeben.

Die DNA-Extraktionen aus Wirtspflanzen mittels *DNeasy* lieferten für alle Wirte von *B. tabaci* vergleichbare Ergebnisse. Hier sind lediglich die Ergebnisse von Extraktionen aus Wassermelonen (Abb. 6.5) und Tomaten (Abb. 6.6) aufgeführt. Die Extraktion nach

der Dellaporta-Methode lieferte eine unreinere DNA (nicht gezeigt), weshalb *DNeasy* besonders für anschließende *real-time* Experimente bevorzugt wurde.



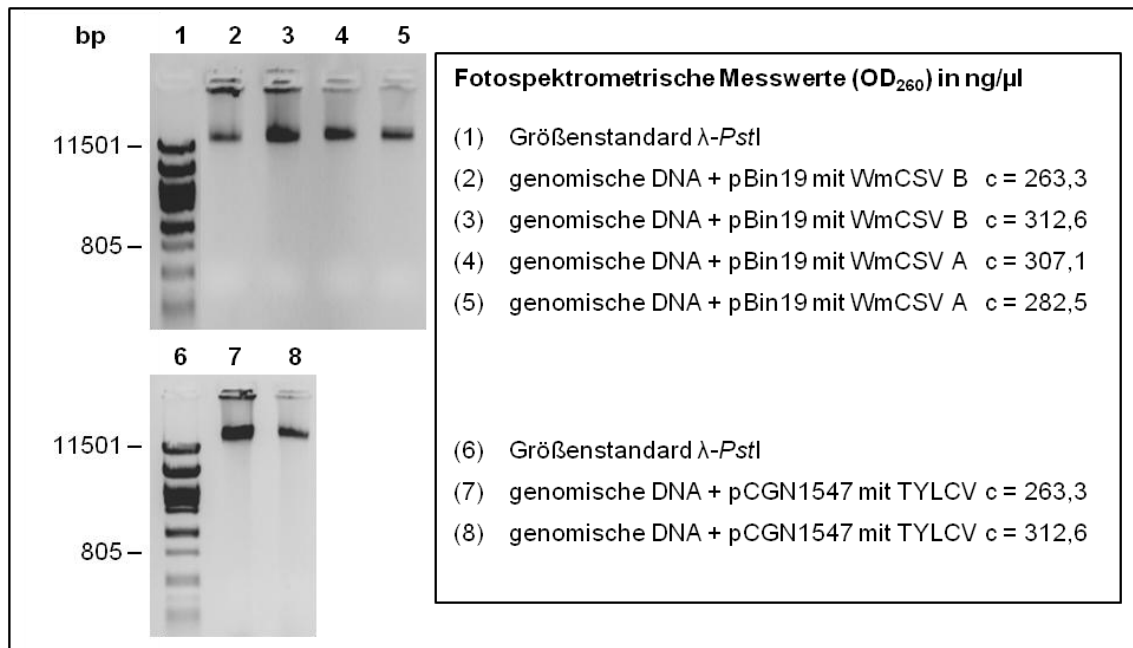
**Abbildung 6.6: Elektrophoretische Darstellung von DNA-Extrakten aus Tomatenblätter mittels *DNeasy Plant Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland).** Dargestellt ist ein Foto, eines 1%igen Agarosegels, welches zuvor mit Ethidiumbromid gefärbt wurde. Zu erkennen sind unter (1) der DNA-Größenstandard  $\lambda$ -PstI (mit linksseitig angegebener Basenpaarlänge zweier Banden), sowie unter (2) bis (5) vier parallel extrahierte DNA aus Tomatenlaubblättern, welche unterschiedlichen Blatttagen entnommen wurden. Die Blattproben (2) bis (4) stammen von einer virusinfizierten Pflanze, Probe (5) von einer virusfreien. Jeweils 5  $\mu$ l der extrahierten DNA wurden auf das Gel aufgetragen. Die DNA-Konzentration [c] der jeweiligen Extraktionen wurde mittels Fotospektrometer (NanoDrop) bestimmt und ist in ng/ $\mu$ l angegeben.

#### 6.1.6 DNA-Extraktion aus *Agrobacterium tumefaciens*

Die Genome vom WmCSV und TYLCV lagen zunächst nur als Insertionen von Plasmiden vor, mit denen Agrobakterien transformiert worden waren. Um für quantitative Untersuchungen geeignete Standardreihen zu kreieren, mussten die Plasmide in *Escherichia coli* transferiert werden, in denen sie sich leicht vermehren und aus denen sie sich einfach extrahieren ließen.

Die Konzentrationsmessung der DNA-Extrakte aus Agrobakterien, lieferte trotz vergleichsweise relativ schwacher Banden im Gel, sehr hohe DNA-Konzentrationen (Abb. 6.7). Diese Werte resultieren aus Unreinheiten des Extrakts, welche die Werte verfälschen. Die Verunreinigungen sind im Gelfoto an einem Schmier, der sich von der Proben tasche bis zur DNA-Bande zieht, zu erkennen. Auf die anschließende Transformation von kompetenten *Escherichia coli* Zellen hatten diese Verunreinigungen keinen erkennbaren Effekt.





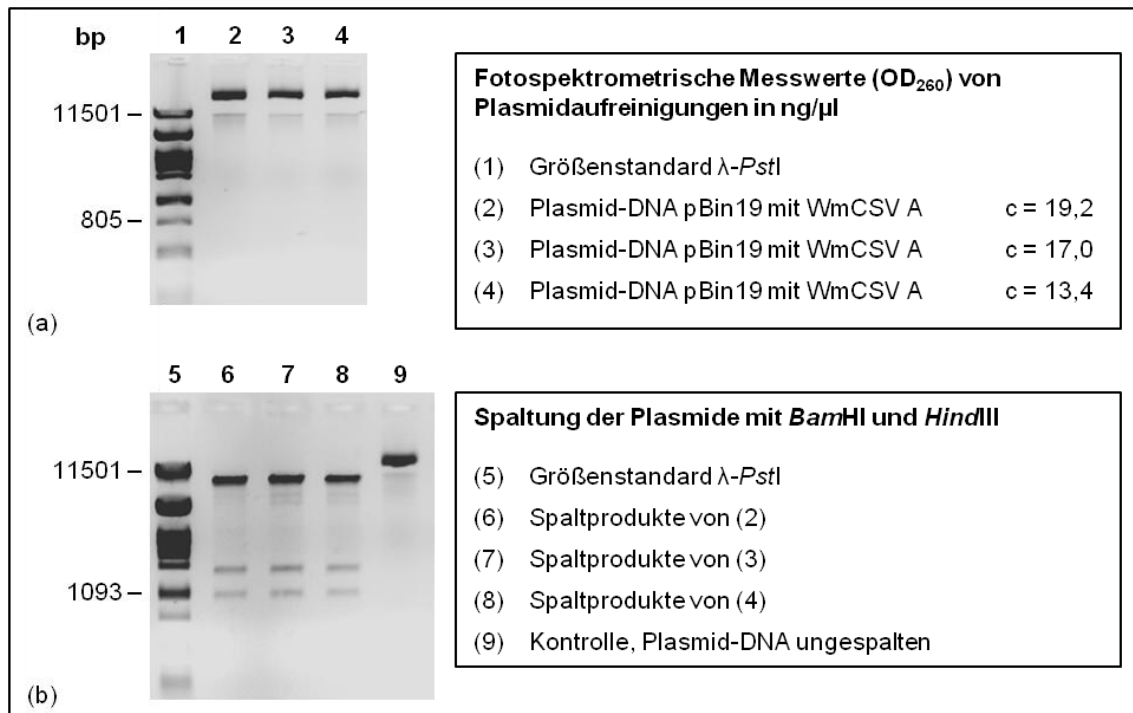
**Abbildung 6.7: Elektrophoretische Darstellung von DNA-Extrakten aus Agrobakterien.** Dargestellt sind zwei Fotos von 1%igen Agarosegelen. Die Gele wurden zuvor mit Ethidiumbromid gefärbt und dann unter UV-Licht fotografiert. Je Virus bzw. Genomkomponente wurden zwei Extraktionen parallel durchgeführt. Jeweils 5 µl der extrahierten DNA wurden auf das Gel aufgetragen. Nach Inkubation der Gele im elektrischen Feld war die extrahierte DNA jeweils als fluoreszierende Bande im UV-Licht zu erkennen. Die DNA-Konzentration [c] der jeweiligen Extraktionen wurde mittels Fotospektrometer (NanoDrop) bestimmt und ist in ng/µl angegeben.

### 6.1.7 Plasmid-DNA-Extraktion aus *Escherichia coli* nach dem *NucleoSpin Plasmid Protocol* (MACHEREY-NAGEL) und Testspaltung

Aus verschiedenen Übernachtskulturen von transformierten *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  wurde die Plasmid-DNA aufgereinigt (Abb. 6.8a). Zu erkennen sind zwei Banden, welche die verschiedenen Konformationen der Plasmide widerspiegeln. Plasmid-DNA liegt hauptsächlich in drei unterschiedlichen Konformationen vor, stark aufgespult (*supercoiled*), eingekerbt zirkular (*nicked*) und linear (Cole *et al.* 2000, Balagurumoorthy *et al.*, 2008). In Agarosegelen befindet sich, aufgrund ihrer geringeren Oberfläche, die *supercoiled* Form am weitesten von der Geltasche entfernt. Da in Abbildung 6.8a lediglich zwei Banden zu erkennen sind, kann keine eindeutige Zuordnung erfolgen. Der Vektor pBin19 ließ sich in nur sehr geringer Konzentration, im Vergleich zu pCGN1547, welcher TYLCV trägt, aufreinigen (nicht gezeigt). Es handelt sich bei pBin19 um ein sogenanntes *low-copy* Plasmid, welches nur in geringer Kopienzahl in den Bakterien vorliegt.

Die Testspaltung mit den Restriktionsenzymen *Hind*III und *Bam*HI liefert drei DNA-Fragmente (Abb. 6.8b). Zum einen den Vektor mit 11836 Nukleotiden Länge und zum

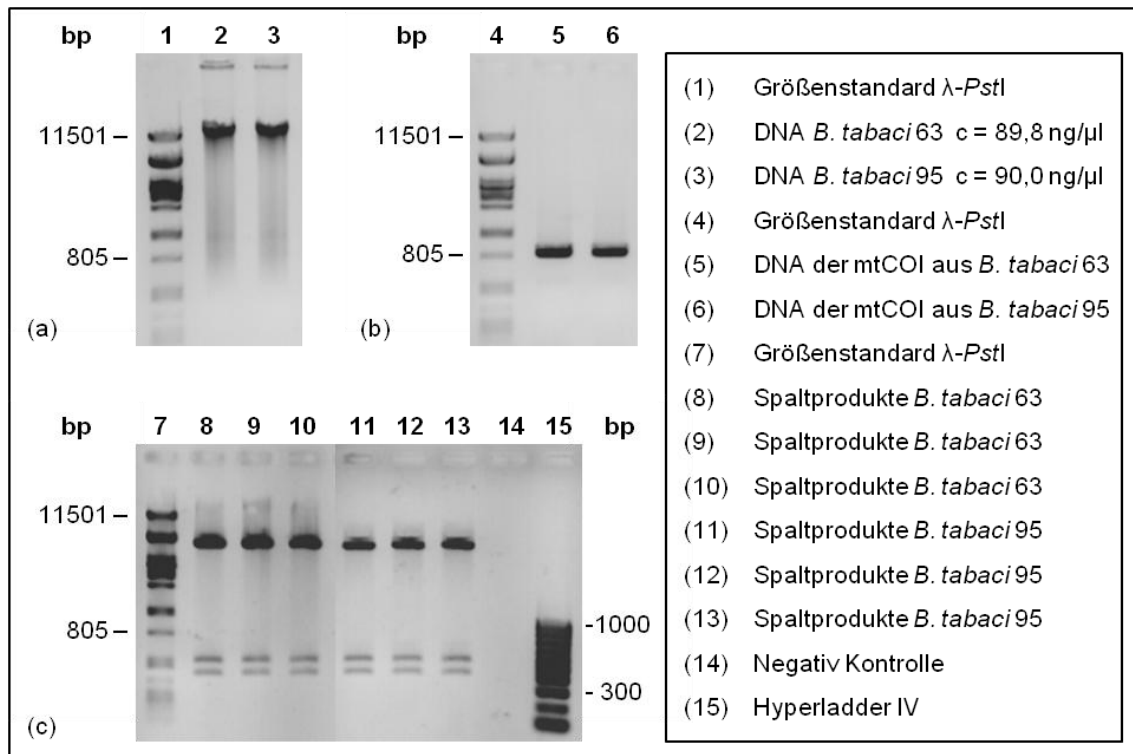
anderen das inserierte Genom von WmCSV A, welches von *Bam*HI an einer Stelle gespalten wurde. Die zwei Fragmente sind 1594 und 1100 Nukleotide lang.



**Abbildung 6.8: Elektrophoretische Darstellung von DNA-Extrakten aus *Escherichia coli* und deren Produkte nach Spaltung mit Restriktionsenzymen.** Dargestellt sind zwei Fotos von 1%igen Agarosegelen, die unter UV-Licht aufgenommen wurden, nachdem sie mit Ethidiumbromid gefärbt worden waren. Es wurden drei Plasmid-Extraktionen (a) bzw. Restriktionsspaltungen (b) parallel durchgeführt. Jeweils 5  $\mu$ l der extrahierten DNA und 8  $\mu$ l der Spaltprodukte wurden in die Geltaschen gefüllt. Nach Inkubation der Gele im elektrischen Feld war die DNA als fluoreszierende Banden im UV-Licht zu erkennen. Doppelbanden traten auf, da Plasmid-DNA in unterschiedlichen Konformationen vorliegt, die sich unterschiedlich schnell durch die Gelmatrix bewegen können. Die DNA-Konzentration [c] der jeweiligen Extraktionen wurde mittels Fotospektrometer (NanoDrop) bestimmt und ist in ng/ $\mu$ l angegeben. Die Produkte der Restriktionsspaltung haben Längen von 11836, 1594 und 1100 Basenpaaren (bp).

## 6.2 Speziesbestimmung durch Sequenzanalyse des mitochondrialen Cytochrom-Oxidase I (mtCOI) Gens

Um die *B. tabaci* Populationen 63 und 95 jeweils einer kryptischen Art zuzuordnen zu können, wurde die mtCOI der Insekten kloniert und sequenziert. In einer Testspaltung wurde die Ligation der mtCOI mit dem Klonierungsvektor überprüft (Abb. 6.9). Die Summe der Basenpaare des herausgespaltenen Inserts von ca. 1000 bp entspricht dabei der erwarteten Größe für die DNA der mtCOI (ca. 900 bp), plus der Fragmente der *multiple cloning side* des Vektors.



**Abbildung 6.9: Elektrophoretische Darstellung von DNA aus *B. tabaci* Population 63 und 95, PCR- und Restriktionsprodukte zur Amplifikation bzw. Nachweis der mitochondrialen Cytochrom-Oxidase I.** (a) DNA-Extrakte aus je 100 Individuen. In der Legende rechts ist die Konzentration c der DNA angegeben. Je 5  $\mu$ l wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. (b) PCR Produkte nach Reaktion zur Amplifikation der mtCOI nach Frohlich *et al.* (1999). Die Produkte haben eine Länge von jeweils ca. 900 bp. (c) Spaltprodukte des Vektors pDrive mit mtCOI als Insert durch das Restriktionsenzym *EcoRI*. Zu erkennen sind je drei Banden. Die obere Bande repräsentiert den Vektor pDrive mit ca. 3850 bp Länge. Die unteren Banden von ca. 600 bp und 400 bp repräsentieren die DNA der mtCOI, welche eine Restriktionsschnittstelle für *EcoRI* aufweist.

### 6.3 Standardreihen und Standardkurven zur Quantifizierung von WmCSV und TYLCV

#### 6.3.1 Standardreihe und Standardkurve von WmCSV A

Das Primerdesign und die Optimierung der qPCR für WmCSV, stellten sich im Vergleich zu TYLCV relativ schwierig dar. Nachdem eine stabil laufende Methode etabliert war, wurde eine 10-fach Verdünnungsreihe aus Plasmid-DNA hergestellt, die aliquotiert und für möglichst viele Versuche verwendet wurde. Die DNA-Konzentration in der geringsten Verdünnungsstufe, welche in die qPCR eingesetzt wurde, betrug ca. 0,519 ng/ $\mu$ l. In dieser ersten Verdünnungsstufe, war demzufolge eine Viruskonzentration von ca.  $3,309 \times 10^7$  Molekülen pro  $\mu$ l vorhanden. Je Verdünnungsstufe und Parallele wurde in der qPCR ein exponentieller Anstieg detektiert, der in

einer Plateauphase mündet (Abb. 6.10a). In dieser Plateauphase verlangsamte sich die Reaktion durch kompetitive Effekte zwischen Primer und Template oder durch absolute oder relative Verarmung eines der nötigen Reaktionspartner. So zum Beispiel durch die begrenzte Menge der Primer oder gar durch die im Verlauf der Reaktion abnehmende Enzymaktivität. Zu Beginn der exponentiellen Phase war die qPCR am effektivsten. Daher wurde an dieser Stelle ein für alle Einzelreaktionen gemeinsamer Schwellenwert gesetzt (*Threshold*).

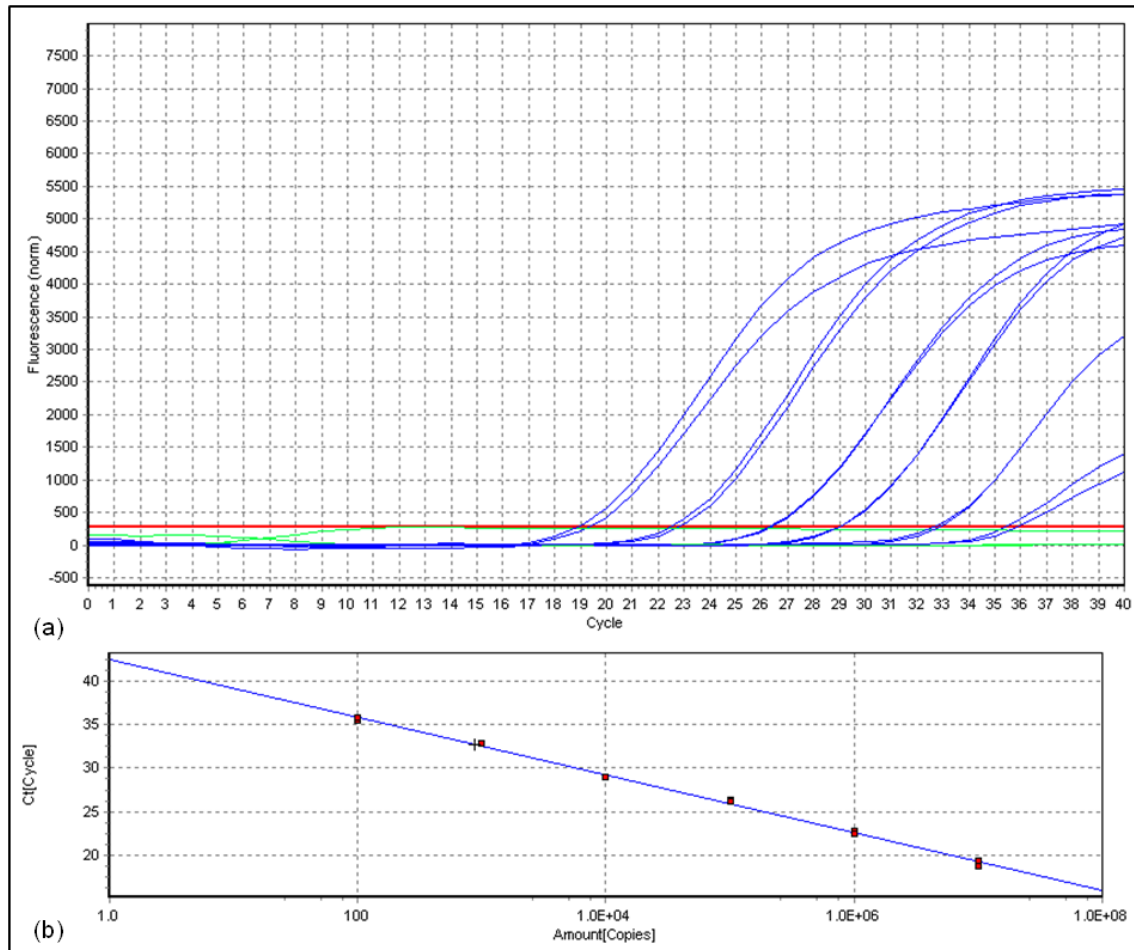
Da verschiedene Versuche miteinander verglichen wurden, war darauf zu achten, den *Threshold* immer ähnlich einzustellen. Anderenfalls würden die errechneten Werte verzerrt und ein Vergleich mit anderen Quantifizierungen wäre nicht mehr möglich. Für die Auswertung der Quantifizierung von WmCSV A in dieser Arbeit, wurde der *Threshold* immer zwischen 250 und 450 Fluoreszenzeinheiten eingestellt.

Die Schnittpunkte (*C<sub>q</sub>*) der Fluoreszenzkurven mit dem *Threshold* lassen sich graphisch linear darstellen, da eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem *C<sub>q</sub>* besteht (Rawer, 2006). Die daraus resultierende Standardkurve hat im gezeigten Beispiel (Abb. 6.10b) einen Anstieg von -3,302, was dem Idealwert von -3,322 für 10-fach Verdünnungen sehr nahe kommt. Aus dem Schnittpunkt der Standardkurve mit der y-Achse lässt sich ableiten, nach welchem Zyklus der qPCR ein einziges Matrizen-Molekül in der Amplifikation theoretisch den *Threshold* schneiden würde. Dieser Wert lag bei 42,4 Zyklen. Er war bedeutsam für die einzustellende Zyklenzahl der qPCR, beim Nachweis von sehr geringen Molekülmengen. Da beim Nachweis von WmCSV aus Speicheldrüsen mit sehr geringen Molekülmengen zu rechnen war, wurde für alle Versuche eine Zyklenzahl von 42 gewählt. Somit wurde eine Nachweisgrenze gesetzt, die bei ca. 2 Molekülen lag. Mehr Zyklen waren nicht nötig, da nach ca. 41 Zyklen auftretende Primerdimere eine eindeutige Auswertung verhinderten.

Die qPCR verlief, im gezeigten Beispiel (Abb. 6.10), mit einer rechnerischen Effizienz von 1,01. Diese ließ sich nach folgender Formel errechnen.

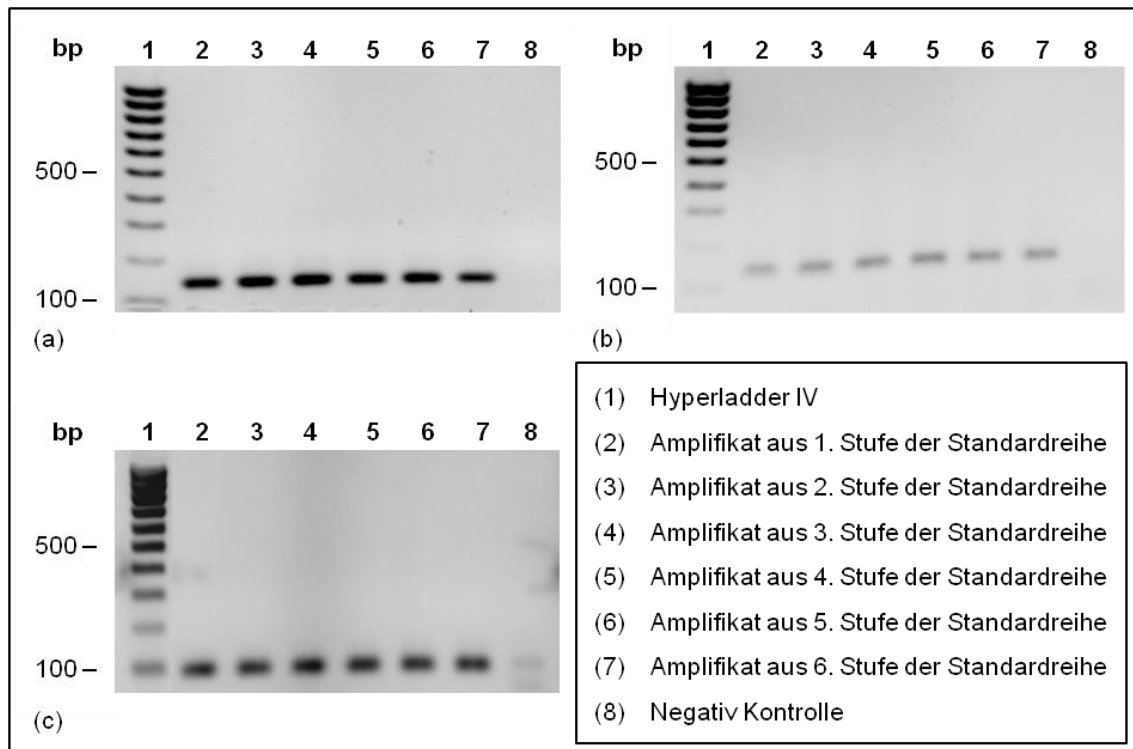
$$E = 10^{(-1/\text{Anstieg})} - 1$$

Im Idealfall beträgt die Effizienz  $E = 1$ . Der rechnerische *C<sub>q</sub>*-Wert für 10 Millionen Moleküle lag bei 19,4.



**Abbildung 6.10: Standardreihe und Standardkurve von WmCSV A.** (a) Graphische Darstellung der Messwerte aus der Fluoreszenzmessung nach jedem Zyklus der qPCR, jeweils als Doppelbestimmung in einer 10-fach Verdünnungsreihe mit 6 Stufen (blaue Kurven). Die rechnerische Effizienz dieser Standardreihe liegt bei 1,01. In grün sind die Graphen der *Non template control* (NTC) und Wasserkontrolle dargestellt. Der *Threshold* liegt bei 270 Fluoreszenzeinheiten. (b) Standardkurve mit einem Anstieg von -3,302. Der Schnittpunkt mit der y-Achse liegt bei  $y = 42,4$  ( $C_t = C_q$ ).

Die Spezifität der Primer wurde mittels Gelelektrophorese der qPCR-Produkte überprüft (Abb. 6.11). qPCR-Produkte aus pflanzlichen und tierischen DNA-Extrakten, die Virusgenome enthielten, stellten sich gleich dar. Unter Verwendung des KAPA SYBR FAST QPCR Master Mix, wurden ebenfalls vergleichbare Bandenmuster erzielt (nicht gezeigt).

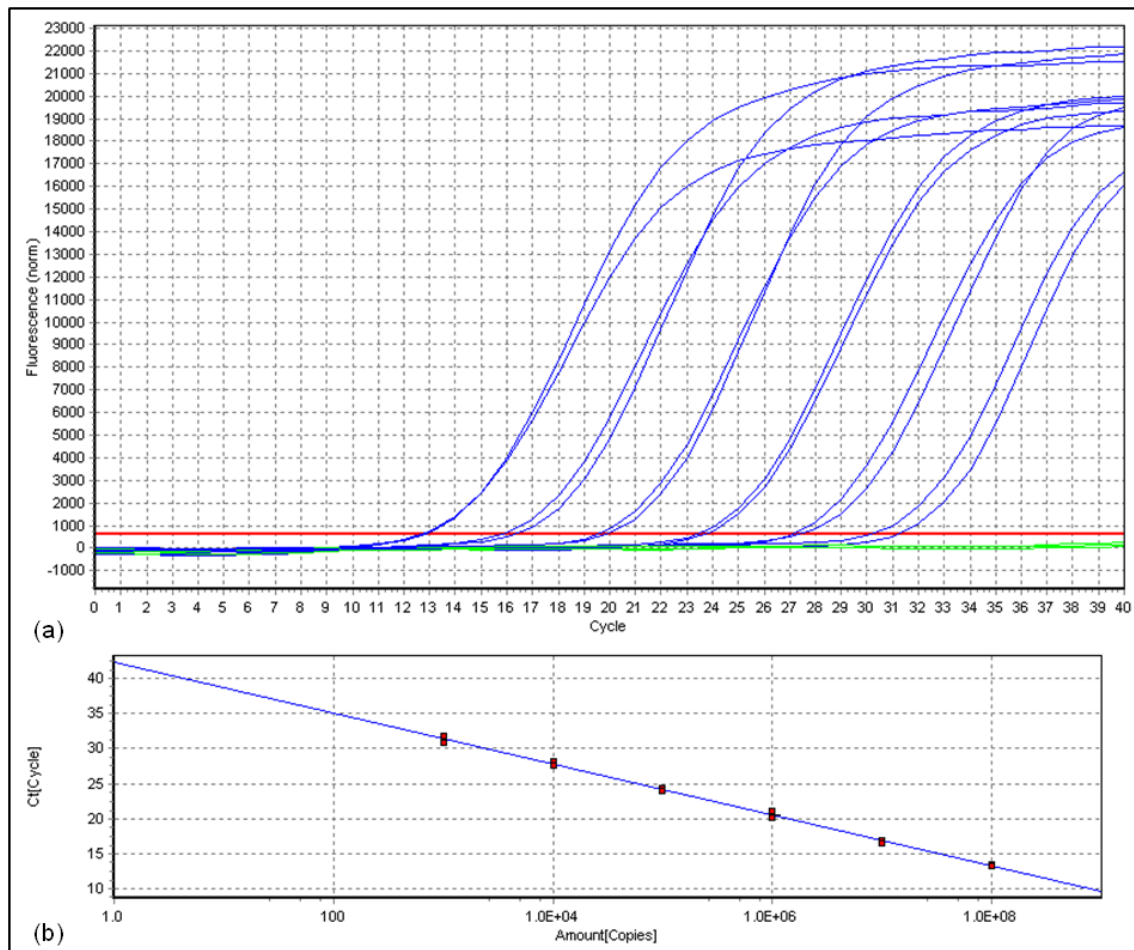


**Abbildung 6.11: Fotografien gefärbter Agarosegele mit qPCR-Produkten aus der Quantifizierung vom WmCSV und TYLCV mit TaqMan Sonden.** Jeweils 10 µl der qPCR-Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetragen. Die Einzelbanden belegen die Spezifität der Primer. (a) qPCR-Produkte der Amplifikation der Standardreihe von WmCSV A. (b) qPCR-Produkte der Amplifikation der Standardreihe von WmCSV B. (c) qPCR-Produkte der Amplifikation der Standardreihe von TYLCV.

### 6.3.2 Standardreihe und Standardkurve von TYLCV

Für die Auswertung der Quantifizierung von TYLCV, wurde der Bereich der y-Achse, in dem der *Threshold* angesiedelt war, ebenfalls begrenzt. Das Intervall wurde hier zwischen 350 und 700 Fluoreszenzeinheiten gewählt. Abbildung 6.12a zeigt beispielhaft den Graphen einer Standardreihe für die Quantifizierung von TYLCV. In der geringsten Verdünnungsstufe wurde Plasmid-DNA mit einer Konzentration von ca. 2,16 ng/µl eingesetzt. Die daraus resultierende Standardkurve hat im gezeigten Beispiel (Abb. 6.12b) einen Anstieg von -3,621. Der Schnittpunkt der Standardkurve mit der y-Achse lässt erkennen, dass theoretisch ein einzelnes Matrizen-Molekül nach 42,3 Zyklen ein Signal oberhalb des *Thresholds* liefern würde. Die eingestellte Zyklenzahl in Quantifizierungen wurde daher auf 42 eingestellt, wodurch die Nachweisgrenze bei ca. 2 Molekülen lag. Die qPCR verlief in dem in Abbildung 6.12 gezeigten Beispiel mit einer rechnerischen Effizienz von 0,98. Der rechnerische Cq-Wert für 10 Millionen Moleküle lag bei 16,1 und war somit geringer als der von WmCSV A, bei gleicher Molekülmenge. Dies beruht auf den unterschiedlichen Primer-

und Matrizenstrukturen, sowie den damit verbundenen unterschiedlichen Reaktionsbedingungen.



**Abbildung 6.12: Standardreihe und Standardkurve von TYLCV.** (a) Graphische Darstellung der Messwerte aus der Fluoreszenzmessung nach jedem Zyklus der qPCR, jeweils als Doppelbestimmung in einer 10-fach Verdünnungsreihe mit 6 Stufen (blaue Kurven). Die rechnerische Effizienz dieser Standardreihe liegt bei 0,98. In grün sind die Graphen der *Non template control* (NTC) und Wasserkontrolle dargestellt. Der *Threshold* liegt bei 620 Fluoreszenzeinheiten. (b) Standardkurve mit einem Anstieg von -3,621. Der Schnittpunkt mit der y-Achse liegt bei  $y = 42,3$  ( $C_t = C_q$ ).

### 6.3.3 Vergleich von Standardreihen aus Plasmiden

Verschiedene Aufreinigungen des gleichen Plasmids, die in Form von Verdünnungsreihen als Standard in absoluten Quantifizierungen eingesetzt werden, sollten möglichst die gleichen Kurvenverläufe bzw. Ergebnisse erzeugen. Um die Robustheit und Reproduzierbarkeit der Quantifizierungen zu untersuchen, wurden mehrere Verdünnungsreihen für WmCSV A und TYLCV aus aufgereinigten Plasmiden hergestellt und die daraus hervorgegangenen Standardreihen verglichen.

Ein Cq-Wert von 3.322 bedeutet einen 10-fachen Unterschied in der Virusmengenermittlung. In Tabelle 6.1 sind die Virusmengen (Z) der verschiedenen Standardreihen für je eine allgemeine Verdünnungsstufe (x) angegeben. Die Tabelle zeigt weiterhin die von der PCR-Maschine und dem realplex<sup>4</sup> Programm (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) erstellten Cq-Werte für 5 Verdünnungsstufen ( $Z \times 10^8$  bis  $Z \times 10^4$ ), sowie die dazugehörigen auf  $1 \times 10^x$  normierten Cq-Werte. Im unteren Teil der Tabelle sind die Mittelwerte aus den normierten Cq-Werten angegeben, sowie die jeweilige Standardabweichung.

Für WmCSV wurden mehr Verdünnungsreihen aus unterschiedlichen Plasmidaufreinigungen angefertigt, als für TYLCV, da die Standardreihen für WmCSV stärker schwankten. Somit war eine größere Parallelenanzahl notwendig, um genauere Mittelwerte zu erhalten.

Aus den Standardabweichungen der 5 Verdünnungsstufen ließ sich eine durchschnittliche Standardabweichung ermitteln. Sie betrug für WmCSV A 2,28. Dieser Wert wurde in die dem Logarithmus zugrunde liegende Gleichung  $2^{Cq}$  eingesetzt.

$$2^{2,28} \approx 4,86$$

Das Ergebnis von rund 4,86 bedeutet, dass bei einer Wiederholung der angefertigten Versuche, die erhaltenen Konzentrationen an WmCSV, allein durch eine neu angesetzte Standardreihe, eine Abweichung um einen Faktor von durchschnittlich 4,86 aufweisen können.

Analog betrug die aus den 5 Verdünnungsstufen ermittelte durchschnittliche Standardabweichung für TYLCV den Wert 1,01. Dieser Wert wurde ebenfalls in die dem Logarithmus zugrunde liegende Gleichung  $2^{Cq}$  eingesetzt.

$$2^{1,01} \approx 2,01$$

Somit konnten die erhaltenen Konzentrationen von TYLCV, allein durch eine neu angesetzte Standardreihe, eine Abweichung um einen Faktor von durchschnittlich 2,01 haben.

Demnach wird geschlussfolgert, dass die in der qPCR berechneten absoluten Viruskonzentrationen, nur als Näherungswerte der in der Probe tatsächlich enthaltenen Virusmengen einzuschätzen sind. Darüber hinaus sollten alle durchzuführenden Versuche, die gemeinsam diskutiert werden, mit ein und derselben Standardreihe durchgeführt werden. Dadurch werden die gezeigten Standardabweichungen (Faktoren) zumindest innerhalb einer Versuchsreihe vermieden.



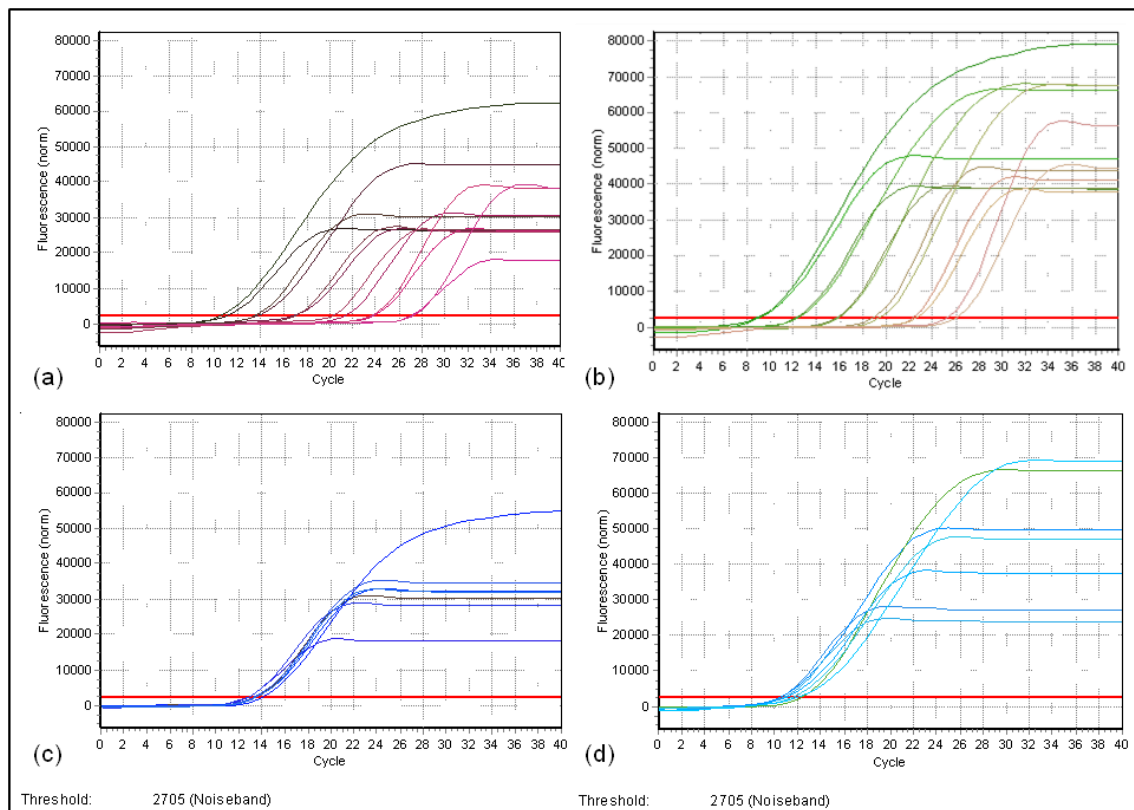
**Tabelle 6.1: Cq-Werte aus verschiedenen Standardreihen von WmCSV und TYLCV.** Angegebenen sind auch die relevanten Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen (St.abw.), sowie die Differenz zwischen den durchschnittlichen Cq-Werten der WmCSV-Standardreihen und den durchschnittlichen Cq-Werten der TYLCV-Standardreihen.

	Berechnete Virusmenge (Zx10 <sup>x</sup> )	Cq Differenz zu 1x10 <sup>x</sup>	Cq bei Zx10 <sup>8</sup>	Cq bei 1x10 <sup>8</sup>	Cq bei Zx10 <sup>7</sup>	Cq bei 1x10 <sup>7</sup>	Cq bei Zx10 <sup>6</sup>	Cq bei 1x10 <sup>6</sup>	Cq bei Zx10 <sup>5</sup>	Cq bei 1x10 <sup>5</sup>	Cq bei Zx10 <sup>4</sup>	Cq bei 1x10 <sup>4</sup>
WmCSV												
Standardreihen	2.98x10 <sup>x</sup>	1.575	13.70	15.28	17.10	18.67	20.50	22.08	24.00	25.58	27.10	28.68
	6.38x10 <sup>x</sup>	2.669	14.93	17.60	19.71	22.39	23.03	25.71	26.35	29.02	29.67	32.34
	2.92x10 <sup>x</sup>	1.546	19.58	21.13	22.90	24.45	26.60	28.15	29.92	30.84	33.09	34.64
	1.00x10 <sup>x</sup>	0.000	20.77	20.77	24.18	24.18	27.29	27.29	31.10	31.10	33.33	33.33
	1.00x10 <sup>x</sup>	0.000	19.66	19.66	22.98	22.98	26.19	26.19	30.13	30.13	34.51	34.51
	1.00x10 <sup>x</sup>	0.000	17.17	17.17	20.49	20.49	23.80	23.80	27.30	27.30	30.87	30.87
	5.48x10 <sup>x</sup>	2.454	17.28	19.73	20.60	22.85	25.66	28.12	28.98	31.43	33.46	35.91
	5.55x10 <sup>x</sup>	2.472	16.13	18.58	19.45	21.92	24.30	26.77	27.62	30.09	31.55	34.02
	3.95x10 <sup>x</sup>	1.982	16.86	18.84	20.18	22.16	23.90	25.88	27.22	29.20	30.66	32.64
	3.31x10 <sup>x</sup>	1.727	19.02	20.75	22.34	24.07	24.75	26.48	28.55	30.28	32.14	33.87
	3.31x10 <sup>x</sup>	1.727	20.49	22.22	23.81	25.54	26.12	27.85	28.71	30.48	32.76	34.49
	1.22x18 <sup>x</sup>	0.287	15.21	15.50	17.20	17.49	21.60	21.89	24.66	24.95	28.44	28.73
	1.09x10 <sup>x</sup>	0.124	16.57	16.69	19.62	19.74	22.94	23.07	26.53	26.19	29.85	29.97
Mittelwerte				18.76		22.07		25.64		28.97		32.62
St.abw.				2.20		2.38		2.22		2.22		2.36
TYLCV												
Standardreihen	1.00x10 <sup>x</sup>	0.000	13.09	13.09	16.11	16.11	20.32	20.32	24.57	24.57	27.69	27.69
	9.37x10 <sup>x</sup>	3.228	8.56	11.79	11.80	15.03	15.30	18.53	19.10	22.33	22.78	26.01
	2.74x10 <sup>x</sup>	1.454	11.94	13.39	13.98	15.43	17.37	18.82	20.90	22.35	25.38	26.83
	9.65x10 <sup>x</sup>	3.271	8.18	11.45	11.50	14.77	14.86	18.13	18.76	22.03	20.35	23.62
	7.55x10 <sup>x</sup>	2.916	9.25	12.17	11.74	14.66	15.15	18.07	18.69	21.61	22.48	25.40
Mittelwerte				12.38		15.20		18.77		22.58		25.91
St.abw.				0.83		0.59		0.92		1.15		1.54
Differenz				6,38		6,87		6,87		6,39		6,71

#### 6.3.4 Quantifizierung und Vergleich von WmCSV A- und B-Komponente hinsichtlich ihres Verhältnis

Um richtige Aussagen zur Quantifizierung von WmCSV treffen zu können, wurde das Verhältnis bestimmt, in dem beide Komponenten in Plasmidaufreinigungen und Wirtspflanzen vorliegen. Hierfür wurden aus Plasmidaufreinigungen Verdünnungsreihen hergestellt und diese als Standardreihen in die qPCR eingebracht. Anhand von DNA aus WmCSV infizierten symptomatischen Wirtspflanzen, die in gleichen Konzentrationen in beide Reaktionen (A- und B-Komponente) eingebracht wurden, konnte das Verhältnis der beiden Komponenten zueinander bestimmt werden.

Abbildung 6.13 zeigt die Graphen der Standardreihen für die A- und B-Komponente mit einer Anfangskonzentration von jeweils  $1 \times 10^9$  Molekülen pro  $\mu\text{l}$ . Der  $C_q$  für die A-Komponente lag bei dieser Verdünnungsstufe bei 10,7 (a). Der  $C_q$  für die B-Komponente bei 8,8 (b). Die Unterschiede resultierten aus den unterschiedlichen Bedingungen die notwendig waren, damit die jeweiligen Reaktionen optimal verliefen. Primer- und Matrizenstruktur, sowie die damit verbundene optimale individuelle *Annealing*-Temperatur waren dabei ausschlaggebend.



**Abbildung 6.13: Kurvenverlauf für WmCSV A und B Standardreihen und Amplifikat aus infizierten Wassermelonen.** Dargestellt sind die Graphen aus Werten von Fluoreszenzmessungen, die von der PCR-Maschine während der qPCR detektiert wurden. (a) Graphische Darstellung der Standardreihe für WmCSV A in 6 Verdünnungsstufen einer 10-fach Verdünnung, mit einer Anfangskonzentration von  $1 \times 10^9$  Molekülen pro  $\mu\text{l}$ . Jeweils als Doppelbestimmung. (b) Standardreihe für WmCSV B in 6 Verdünnungsstufen einer 10-fach Verdünnung, mit einer Anfangskonzentration von ebenfalls  $1 \times 10^9$  Molekülen pro  $\mu\text{l}$ . Jeweils als Doppelbestimmung. (c) Graphen aus Messwerten der A-Komponenten Quantifizierung in 3 biologischen Parallelen und jeweils als Doppelbestimmung (dunkelblau). (d) Graphen aus Messwerten der B-Komponenten Quantifizierung in 3 biologischen Parallelen und jeweils als Doppelbestimmung (hellblau).

Im Nachweis für die A-Komponente aus DNA von symptomatischen Wirtspflanzen (Abb. 6.13c) wurde ein durchschnittlicher  $C_q$  von 13,5 berechnet, was einer Virusmenge von ca. 120 Millionen Molekülen pro  $\mu\text{l}$  entspricht. Im Nachweis für die B-Komponente (Abb. 6.13d) betrug der durchschnittliche  $C_q \approx 11,5$ , was einer

Virusmenge von ebenfalls ca. 120 Millionen Molekülen pro  $\mu\text{l}$  entspricht. Durchgeführte Kontrollen ohne DNA (*non template*), sowie Negativ- und Wasser-Kontrollen sind nicht dargestellt. Aus den Ergebnissen dieses Versuchs wird geschlussfolgert, dass das Verhältnis von A- und B-Komponente bei WmCSV bei 1:1 lag. Alle nachfolgenden Versuche zur Quantifizierung von WmCSV, wurden daher nur anhand einer Komponente durchgeführt (A-Komponente).

#### 6.4 DNA-Gehalt pro einem durchschnittlichen Individuum *B. tabaci*

Absolut quantifizierte Virusmengen werden in dieser Arbeit häufig auf 100 ng extrahierte DNA bezogen. Im Nachfolgenden wird erläutert weshalb gerade diese Zahl ausgewählt wurde.

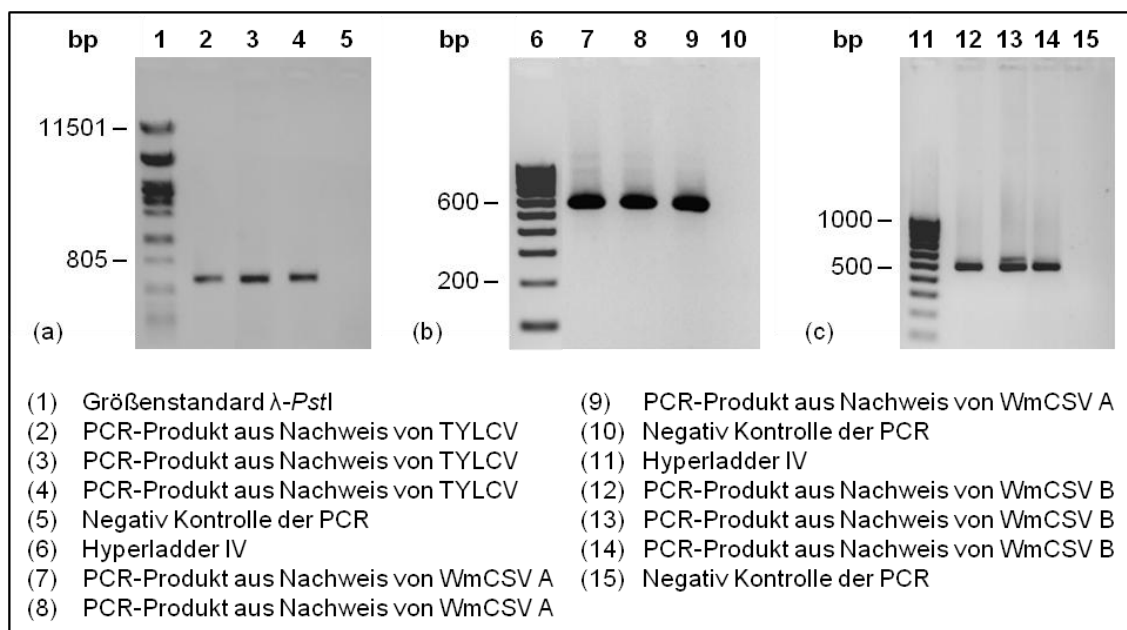
Nach den verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden aus Gruppen von Weiße Fliegen (s. Anhang 6.1), ließen sich unterschiedliche Mengen an DNA pro durchschnittlichen Individuum isolieren. Der Kern einer durchschnittlichen *B. tabaci* Zelle enthält bei Männchen 1,04 pg DNA und bei den diploiden Weibchen 2,06 pg. Ein pg DNA enthält 980 Mbp. (Brown *et al.*, 2005). Bei einer Verteilung von Männchen und Weibchen von 1:1 ergibt sich eine durchschnittliche DNA-Masse von 1,55 pg pro Zellkern. Bei Kenntnis der Anzahl an Zellen, aus denen eine Weiße Fliege besteht, kann somit die Gesamtmasse an Kern-DNA berechnet werden. Da von *B. tabaci* eine genaue Zellzahl von adulten Individuen jedoch nicht bekannt ist, wird ein Überschlag angestrebt. Hierzu wurde folgende Überlegung getätigt. Die ca. 2,5 mm große Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* besteht aus etwa 100-mal mehr Zellen als der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, der in der Regel im adulten Zustand 959 somatische Zellkerne besitzt (Alberts *et al.*, 2004). Da *B. tabaci* ebenfalls ein komplexes Insekt ist, wird davon ausgegangen, dass seine Zellzahl ebenfalls wesentlich größer ist als die des Fadenwurms. Da Weiße Fliegen aber mit ca. 1 bis 1,5 mm Körperlänge kleiner sind als *Drosophila*, wird ihre Zellzahl ebenfalls kleiner sein. Bei einer angenommenen Zellzahl von 40000 pro Individuum, beträgt die Masse an Kern-DNA 62 ng. Zu diesen 62 ng kommen noch die Nukleinsäuren der Mitochondrien und der Endosymbionten.

Bei DNA-Extraktionen aus *B. tabaci* wurden durchschnittlich 50 ng (QIAGEN) bzw. 56 ng (Roche) DNA je durchschnittlichem Individuum erhalten. Da bei DNA-Extraktionen niemals die gesamte DNA eines Organismus aufgereinigt werden kann, liegen die tatsächlich in den Individuen vorhandenen Mengen über diesen Werten. Bei der Extraktion nach Shahjahan *et al.*, wurden durchschnittlich 115 ng DNA erhalten. Dieser Wert ist jedoch durch Verunreinigungen verfälscht.

Nach Betrachtung der genannten Fakten, sowie des angestellten Überschlags, wurde für graphische Darstellungen, die aus den Quantifizierungsdaten gefertigt wurden, die ermittelten Virusmengen auf 100 ng extrahierter DNA bezogen, da dieser Wert einen Näherungswert für die durchschnittliche DNA-Menge eines Individuums *B. tabaci* darstellt. Bestätigen ließ sich dieser Überschlagn durch einen Vergleich von Daten, die aus einzelnen Individuen und aus extrahierter DNA von Gruppen von 100 Individuen gesammelt wurden (s. Punkt 3.2.5).

### 6.5 Selektion einer nicht übertragenden *B. tabaci* Population aus der schwach übertragenden Population 95

Abbildung 6.14 (a) zeigt Amplifikate der Kontroll-PCR zum Nachweis der Virusbeladung von 3 Gruppen Weiße Fliegen der 2. Generation, nachdem sie drei Tage auf TYLCV infizierten symptomatischen Wirtspflanzen und anschließend sieben Tage auf virusfreien Wirtspflanzen inkubiert wurden. Abbildung 6.14 (b) und (c) zeigen, am Beispiel der 3. Generation, dass die zur Übertragung herangezogenen Insekten (Gruppen), WmCSV von den infizierten Wirtspflanzen aufgenommen hatten.



**Abbildung 6.14: Kontroll-PCR für TYLCV und WmCSV mit DNA aus Population 95.** Elektrophoretische Darstellungen mit PCR-Produkten aus Reaktionen mit DNA von jeweils 100 Weiße Fliegen, die zuvor 3 Tage an virusinfizierten symptomatischen Wirtspflanzen gesaugt hatten (jeweils 5  $\mu$ l Amplifikat in 1%ige Agarosegele). (a) Nachweis von TYLCV in 3 Parallelen aus Individuen der selektierten Population 2 der Population 95. Größe der Produkte: 578 bp. (b) Nachweis von WmCSV-A in 3 Parallelen aus Individuen der Population 2B der Population 95. Größe der Produkte: ca. 600 bp. (c) Nachweis von WmCSV-B in 3 Parallelen aus Individuen der Population 2B. Größe der Produkte: ca. 500 bp. In den Negativ-Kontrollen der PCR wurde deionisiertes Wasser anstelle der Matrizen-DNA eingesetzt.

## 6.6 Tabellen zu Quantifizierungsdaten

**Tabelle 6.2: Mediane und Mittelwerte der Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in ganzen Individuen virustragender Individuen von *B. tabaci*.** Angegeben sind ebenfalls jeweils die Standardabweichung, sowie die Mittelwerte der logarithmierten Einzelwerte, die in den Boxplots von Abbildung 3.2 eingezeichnet sind. Ein durchschnittliches Individuum ist mit 100 ng Gesamt-DNA veranschlagt.

	<i>B. tabaci</i> Population	63		95	
	Virusgenome pro gesamtem Insekt	nicht dekontaminiert	2 Tage dekontaminiert	nicht dekontaminiert	2 Tage dekontaminiert
WmCSV	Median aus direkten Quantifizierungsdaten	1,341x10 <sup>8</sup>	5,203x10 <sup>7</sup>	4,500x10 <sup>7</sup>	1,539x10 <sup>7</sup>
	Median logarithmiert	8,127	7,714	7,653	7,179
	Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	8,338	7,700	7,995	7,140
	Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	1,778x10 <sup>9</sup>	5,337x10 <sup>7</sup>	1,734x10 <sup>11</sup>	3,510x10 <sup>7</sup>
	Standardabweichung zum Mittelwert	5,150x10 <sup>9</sup>	1,881x10 <sup>7</sup>	6,248x10 <sup>11</sup>	6,199x10 <sup>7</sup>
	Viren in 100 ng DNA Wirtspflanze (Median)	1,258x10 <sup>9</sup>			
TYLCV	Median aus direkten Quantifizierungsdaten	2,082x10 <sup>6</sup>	4,050x10 <sup>6</sup>	8,578x10 <sup>4</sup>	1,735x10 <sup>4</sup>
	Median logarithmiert	6,318	6,606	4,930	4,239
	Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	6,428	6,100	5,216	3,985
	Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	9,073x10 <sup>6</sup>	5,076x10 <sup>6</sup>	1,383x10 <sup>6</sup>	2,312x10 <sup>4</sup>
	Standardabweichung zum Mittelwert	2,560x10 <sup>7</sup>	5,958x10 <sup>6</sup>	2,439x10 <sup>6</sup>	2,284x10 <sup>4</sup>
	Viren in 100 ng DNA Wirtspflanze (Median)	6,776x10 <sup>7</sup>			

**Tabelle 6.3: Virusgenome pro gesamten Individuen von *B. tabaci* Population 63 und 95 nach 48 h Fütterung von WmCSV und TYLCV in gleichen Konzentrationen.** Angegeben sind die tatsächlichen Viruskonzentrationen, die in den Saccharoselösungen vorlagen. Die Werte der Insekten wurden auf den Wert der Saccharoselösung mit WmCSV normiert. Die Mittelwerte der normierten logarithmierten Einzelwerte, samt ihren Standardabweichungen, dienen der graphischen Darstellung. Zusätzlich sind Faktoren angegeben, die das Verhältnis an Virusgenomen zwischen Virusquelle und Weiße Fliege angeben. Die zugrundeliegenden Daten aus der Fütterung mit Wirtspflanzen (Medianwerte, 2 Tage entladen), entstammen Tabelle 6.2.

	Virus	WmCSV		TYLCV	
	Virus-Gehalt in 1 µl Saccharoselösung	1,25x10 <sup>8</sup>		3,31x10 <sup>8</sup>	
	<i>B. tabaci</i> Population	63	95	63	95
Normierter Virus-Gehalt	Median aus direkten Quantifizierungsdaten	1,000x10 <sup>6</sup>	1,302x10 <sup>5</sup>	2,962x10 <sup>6</sup>	1,239x10 <sup>4</sup>
	Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	1,506x10 <sup>6</sup>	2,504x10 <sup>5</sup>	2,776x10 <sup>6</sup>	2,381x10 <sup>4</sup>
	Standardabweichung zum Mittelwert	1,359x10 <sup>6</sup>	3,290x10 <sup>5</sup>	2,227x10 <sup>6</sup>	3,580x10 <sup>4</sup>
	Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	5,913	4,888	5,878	4,107
	Standardabweichung zum Mittelwert (log)	0,593	0,922	1,185	0,455
Faktor zwischen	Virusgehalt der Wirtspflanze (100 ng DNA) und 1 Individuum <i>B. tabaci</i> (100 ng DNA)	24,23	81,82	16,74	3896,55
	Virusgehalt in 1 µl Saccharoselösung und 1 Individuum <i>B. tabaci</i> (100 ng DNA)	125,00	960,06	42,20	10088,78
	Fütterung mit Pflanzen und Fütterung mit Saccharoselösung	5,16	11,73	2,52	2,59

**Tabelle 6.4: Mittelwerte der WmCSV Genome pro Individuen von *B. tabaci* Population 63 und 95 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kontakt mit infizierten Wirtspflanzen, im Anschluss an eine sechs stündige Hungerphase als exponentielle und logarithmische Zahlen.** Die Signifikanz nach t-Test zwischen den Mittelwerten der Quantifizierungsdaten von Population 63 und 95 beziehen sich auf die Auswertung von jeweils 5 Parallelen (n = 5) mit insgesamt 302 Individuen (N = 3020).

		Virus	WmCSV					
		Zeitpunkt der Probenahme	0 h	1 h	2 h	16 h	5 d	
B. tabaci Population	63	Median aus Quantifizierungsdaten	0	3,614x10 <sup>4</sup>	8,330x10 <sup>6</sup>	2,260x10 <sup>7</sup>	1,627x10 <sup>8</sup>	
		Mittelwert aus Quantifizierungsdaten	0	7,626x10 <sup>4</sup>	1,520x10 <sup>7</sup>	4,676x10 <sup>7</sup>	1,778x10 <sup>9</sup>	
		Standardabweichung zum Mittelwert	0	1,061x10 <sup>5</sup>	2,144x10 <sup>7</sup>	5,818x10 <sup>7</sup>	3,541x10 <sup>9</sup>	
		Mittelwert der logarithm. Einzelwerte	0	4,569	6,889	7,379	8,544	
		Standardabw. zum Mittelwert (log)	0	0,586	0,541	0,621	0,807	
		Viren in 100 ng DNA Wirtspflanze	1,926x10 <sup>9</sup>					
	95	Median aus Quantifizierungsdaten	0	3,022x10 <sup>5</sup>	1,676x10 <sup>6</sup>	8,978x10 <sup>6</sup>	4,655x10 <sup>7</sup>	
		Mittelwert aus Quantifizierungsdaten	0	5,081x10 <sup>5</sup>	3,037x10 <sup>7</sup>	4,238x10 <sup>7</sup>	1,207x10 <sup>8</sup>	
		Standardabweichung zum Mittelwert	0	5,625x10 <sup>5</sup>	6,096x10 <sup>7</sup>	5,979x10 <sup>7</sup>	1,436x10 <sup>8</sup>	
		Mittelwert der logarithm. Einzelwerte	0	5,495	6,547	7,249	7,779	
		Standardabw. zum Mittelwert (log)	0	0,497	1,065	0,642	0,599	
		Viren in 100 ng DNA Wirtspflanze	1,928x10 <sup>9</sup>					
			Signifikanz zwischen 63 und 95	nein	ja	nein	nein	nein

Absolute Quantifizierung von WmCSV A und TYLCV in ganzen Individuen, Mitteldärmen und Speicheldrüsen von *B. tabaci* Population 63, 95 und 95-

Die logarithmischen Mediane entsprechen dabei den tatsächlich in der Quantifizierung erhaltenen Medianen. Die logarithmischen Mittelwerte weichen aufgrund des Logarithmierens der Einzelwerte von den in der Quantifizierung berechneten Mittelwerten ab. Deshalb sind in Tabelle 6.5 zusätzlich zu den logarithmischen Mittelwerten, die in der Quantifizierung berechneten Mittelwerte, mitsamt ihrer Standardabweichung, als Dezimalzahlen mit Zehnerpotenzen, angegeben.

**Tabelle 6.5: Mediane und Mittelwerte der Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Wirtspflanzen, sowie in ganzen Individuen, Mitteldärmen und primärer Speicheldrüsen von drei Populationen virustragender Weiße Fliegen.** Angegeben sind ebenfalls jeweils die Standardabweichung, sowie die Mittelwerte der logarithmierten Einzelwerte, die in den Boxplots von Abbildung 3.5, 3.7, 3.8 und 3.16 eingezeichnet sind.

WmCSV	Virusgenome pro 100 ng DNA	Symptomatische Wassermelone			
		Median aus direkten Quantifizierungsdaten	$6,888 \times 10^8$		
		Median logarithmiert	8,838		
		Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	8,814		
		Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	$7,019 \times 10^8$		
		Standardabweichung zum Mittelwert	$2,900 \times 10^8$		
	Virusgenome pro gesamtem Insekt	<i>B. tabaci</i> Population	63	95	95-
		Median aus direkten Quantifizierungsdaten	$4,698 \times 10^7$	$1,869 \times 10^7$	$6,130 \times 10^6$
		Median logarithmiert	7,672	7,272	6,787
		Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	7,671	7,183	6,746
		Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	$5,164 \times 10^7$	$3,149 \times 10^7$	$1,230 \times 10^7$
		Standardabweichung zum Mittelwert	$2,189 \times 10^7$	$5,317 \times 10^7$	$1,972 \times 10^7$
	Virusgenome pro Mitteldarm	Median aus direkten Quantifizierungsdaten	$5,640 \times 10^5$	$2,596 \times 10^4$	$8,627 \times 10^4$
		Median logarithmiert	5,751	4,414	4,936
		Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	5,670	4,866	5,075
		Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	$1,271 \times 10^6$	$4,255 \times 10^6$	$5,784 \times 10^5$
		Standardabweichung zum Mittelwert	$1,268 \times 10^6$	$2,167 \times 10^7$	$1,227 \times 10^6$
	Virusgenome pro Speicheldrüse	Median aus direkten Quantifizierungsdaten	$3,929 \times 10^3$	$1,790 \times 10^2$	$1,250 \times 10^1$
		Median logarithmiert	3,594	2,253	0,699
		Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	3,736	2,140	1,022
		Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	$1,310 \times 10^4$	$1,188 \times 10^3$	$6,867 \times 10^1$
		Standardabweichung zum Mittelwert	$1,713 \times 10^4$	$2,491 \times 10^3$	$8,753 \times 10^1$
TYLCV	Virusgenome pro 100 ng DNA	Symptomatische Tomate			
		Median aus direkten Quantifizierungsdaten	$5,872 \times 10^7$		
		Median logarithmiert	7,769		
		Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	7,792		
		Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	$6,891 \times 10^7$		
		Standardabweichung zum Mittelwert	$3,947 \times 10^7$		
	Virusgenome pro gesamtem Insekt	<i>B. tabaci</i> Population	63	95	95-
		Median aus direkten Quantifizierungsdaten	$4,050 \times 10^6$	$1,040 \times 10^4$	$1,680 \times 10^3$
		Median logarithmiert	6,606	4,017	3,225
		Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	6,099	3,955	3,059
		Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	$5,074 \times 10^6$	$2,233 \times 10^4$	$1,784 \times 10^3$
		Standardabweichung zum Mittelwert	$5,954 \times 10^6$	$2,659 \times 10^4$	$1,491 \times 10^3$
	Virusgenome pro Mitteldarm	Median aus direkten Quantifizierungsdaten	$3,554 \times 10^3$	$2,600 \times 10^1$	$5,500 \times 10^0$
		Median logarithmiert	3,551	1,415	0,740
		Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	3,366	1,439	0,935
		Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	$7,637 \times 10^4$	$1,783 \times 10^2$	$3,114 \times 10^1$
		Standardabweichung zum Mittelwert	$1,814 \times 10^5$	$3,265 \times 10^2$	$6,626 \times 10^1$
	Virusgenome pro Speicheldrüse	Median aus direkten Quantifizierungsdaten	$3,840 \times 10^2$	0	$1,000 \times 10^0$
		Median logarithmiert	2,584	0	0
		Mittelwert der logarithmierten Einzelwerte	2,387	0,215	0,027
		Mittelwert aus direkten Quantifizierungsdaten	$6,293 \times 10^2$	$2,294 \times 10^0$	$8,182 \times 10^{-1}$
		Standardabweichung zum Mittelwert	$7,728 \times 10^2$	$4,647 \times 10^0$	$6,030 \times 10^{-1}$

**Tabelle 6.6:  $\Delta Cq$ -Mittelwerte mit Standardabweichung aus relativer Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus *B. tabaci* Hämolymphe, sowie Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Reziproken der Einzelwerte.**

	Zeit	<i>B. tabaci</i> Population									
		63				95				95-	
				Standardabw. von $\Delta Cq$	$\Delta Cq$			Standardabw. von $\Delta Cq$	$\Delta Cq$		
WmCSV	0h	0,00				0,00				0,00	
	2h	1,57			3,84	0,00			0,00	2,56	
	4h	4,62			7,18	0,00			0,00	1,16	
	6h	10,00			6,47	3,32			7,43	1,76	
	8h	14,21			2,39	4,15			8,30	2,30	
	24h	12,74			4,93	2,62			4,93	3,25	
	30h	11,45			3,73	8,71			8,61	5,93	
	6d	8,73			2,24	10,43			5,64	3,81	
	0h	0,0000			0,0000	0,0000			0,0000	0,0000	
	2h	0,0177			0,0434	0,0000			0,0000	0,0668	
	4h	0,0241			0,0376	0,0000			0,0000	0,0345	
	6h	0,0689			0,0454	0,0120			0,0269	0,0227	
	8h	0,0719			0,0122	0,0151			0,0301	0,0174	
	24h	0,0501			0,0714	0,0167			0,0354	0,0795	
	30h	0,0977			0,0388	0,0400			0,0406	0,0936	
	6d	0,1210			0,0296	0,0821			0,0464	0,0671	
TYLCV	0h	0,00			0,00	0,00			0,00	0,00	
	2h	5,02			4,62	0,00			0,00	1,19	
	4h	4,41			3,87	8,07			7,17	8,34	
	6h	5,47			4,08	6,55			5,67	4,70	
	8h	6,36			2,00	12,11			2,39	2,78	
	24h	7,51			2,56	4,55			5,84	4,35	
	30h	6,10			0,91	6,59			5,71	1,81	
	6d	7,61			2,94	8,57			3,14	1,81	
	0h	0,0000			0,0000	0,0000			0,0000	0,0000	
	2h	0,0924			0,0850	0,0000			0,0000	0,0474	
	4h	0,1518			0,1275	0,0560			0,0497	0,0580	
	6h	0,1112			0,0863	0,0678			0,0587	0,1244	
	8h	0,1707			0,0572	0,0863			0,0229	0,0230	
	24h	0,1443			0,0348	0,0218			0,0442	0,0628	
	30h	0,1666			0,0268	0,0674			0,0584	0,0221	
	6d	0,1473			0,0509	0,1303			0,0565	0,0221	



**Tabelle 6.7: Virusquantifizierungsdaten aus Mitteldärmen von *B. tabaci*, die nach Kontakt mit einer virusinfizierten Wirtspflanze für 10 Tage auf Nicht-Wirtspflanzen transferiert wurden.** Angegeben sind die Virusmengen für einen durchschnittlichen Mitteldarm.

Pop.		63		95		95-		
	Zeitpunkt der Probenahme in Tagen	Mittelwert aus Quantifizierungsdaten	Standardabweichung zum Mittelwert	Mittelwert aus Quantifizierungsdaten	Standardabweichung zum Mittelwert	Mittelwert aus Quantifizierungsdaten	Standardabweichung zum Mittelwert	
WmCSV	0	2,711x10 <sup>6</sup>	1,942x10 <sup>6</sup>	7,091x10 <sup>5</sup>	7,200x10 <sup>5</sup>	3,891x10 <sup>5</sup>	2,032x10 <sup>5</sup>	
	1	3,229x10 <sup>6</sup>	2,903x10 <sup>6</sup>	3,863x10 <sup>5</sup>	4,347x10 <sup>5</sup>	5,632x10 <sup>4</sup>	2,138x10 <sup>4</sup>	
	2	1,602x10 <sup>7</sup>	1,153x10 <sup>7</sup>	3,620x10 <sup>5</sup>	4,217x10 <sup>5</sup>	3,524x10 <sup>5</sup>	4,324x10 <sup>5</sup>	
	4	5,629x10 <sup>6</sup>	3,360x10 <sup>6</sup>	1,552x10 <sup>5</sup>	1,622x10 <sup>5</sup>	2,320x10 <sup>5</sup>	2,732x10 <sup>5</sup>	
	6	1,359x10 <sup>6</sup>	1,774x10 <sup>6</sup>	1,556x10 <sup>6</sup>	2,252x10 <sup>6</sup>	7,423x10 <sup>4</sup>	8,891x10 <sup>4</sup>	
	8	1,039x10 <sup>7</sup>	8,159x10 <sup>6</sup>	1,756x10 <sup>5</sup>	1,307x10 <sup>5</sup>	1,043x10 <sup>5</sup>	2,303x10 <sup>4</sup>	
	10	3,992x10 <sup>6</sup>	2,523x10 <sup>6</sup>	7,255x10 <sup>4</sup>	8,739x10 <sup>4</sup>	3,976x10 <sup>4</sup>	2,955x10 <sup>4</sup>	
		Mittelwert der logarithm. Einzelwerte	Standard-abw. zum Mittelwert (log)	Mittelwert der logarithm. Einzelwerte	Standard-abw. zum Mittelwert (log)	Mittelwert der logarithm. Einzelwerte	Standard-abw. zum Mittelwert (log)	
	0	6,341	0,367	5,699	0,439	5,551	0,226	
	1	6,399	0,366	5,284	0,725	4,727	0,181	
	2	7,136	0,289	5,335	0,548	5,286	0,599	
	4	6,692	0,286	5,038	0,430	5,159	0,502	
	6	5,855	0,593	5,810	0,701	4,636	0,556	
	8	6,781	0,689	5,169	0,305	5,011	0,103	
	10	6,513	0,374	4,412	0,963	4,421	0,578	
	Gehalt in 100 ng DNA aus infizierter Wirtspflanze: 2,54x10 <sup>9</sup> ± 9,14x10 <sup>8</sup>							
		Zeitpunkt der Probenahme in Tagen	Mittelwert aus Quantifizierungsdaten	Standardabweichung zum Mittelwert	Mittelwert aus Quantifizierungsdaten	Standardabweichung zum Mittelwert	Mittelwert aus Quantifizierungsdaten	Standardabweichung zum Mittelwert
	TYLCV	0	6,823x10 <sup>4</sup>	7,403x10 <sup>4</sup>	3,360x10 <sup>2</sup>	3,072x10 <sup>2</sup>	2,830x10 <sup>2</sup>	4,208x10 <sup>2</sup>
1		4,739x10 <sup>4</sup>	1,793x10 <sup>4</sup>	3,453x10 <sup>2</sup>	3,674x10 <sup>2</sup>	4,233x10 <sup>1</sup>	4,509x10 <sup>0</sup>	
2		3,614x10 <sup>4</sup>	1,062x10 <sup>4</sup>	2,027x10 <sup>2</sup>	2,825x10 <sup>2</sup>	1,500x10 <sup>1</sup>	4,000x10 <sup>0</sup>	
4		1,813x10 <sup>4</sup>	1,722x10 <sup>4</sup>	6,400x10 <sup>1</sup>	6,564x10 <sup>1</sup>	4,167x10 <sup>1</sup>	1,710x10 <sup>1</sup>	
6		5,580x10 <sup>4</sup>	7,498x10 <sup>4</sup>	3,400x10 <sup>1</sup>	9,165x10 <sup>0</sup>	3,633x10 <sup>1</sup>	1,060x10 <sup>1</sup>	
8		3,181x10 <sup>4</sup>	6,899x10 <sup>3</sup>	6,600x10 <sup>1</sup>	6,655x10 <sup>1</sup>	1,633x10 <sup>1</sup>	1,387x10 <sup>1</sup>	
10		4,259x10 <sup>4</sup>	3,147x10 <sup>4</sup>	3,500x10 <sup>1</sup>	9,539x10 <sup>0</sup>	2,733x10 <sup>1</sup>	6,807x10 <sup>0</sup>	
		Mittelwert der logarithm. Einzelwerte	Standard-abw. zum Mittelwert (log)	Mittelwert der logarithm. Einzelwerte	Standard-abw. zum Mittelwert (log)	Mittelwert der logarithm. Einzelwerte	Standard-abw. zum Mittelwert (log)	
0		4,658	0,471	2,335	0,564	1,960	0,863	
1		4,653	0,176	2,308	0,601	1,625	0,046	
2		4,544	0,135	1,929	0,733	1,165	0,119	
4		4,132	0,396	1,643	0,462	1,589	0,214	
6		4,415	0,677	1,521	0,115	1,547	0,135	
8		4,496	0,096	1,643	0,502	0,916	0,797	
10		4,538	0,357	1,533	0,119	1,428	0,104	
Gehalt in 100 ng DNA aus infizierter Wirtspflanze: 2,24x10 <sup>8</sup> ± 9,31x10 <sup>7</sup>								

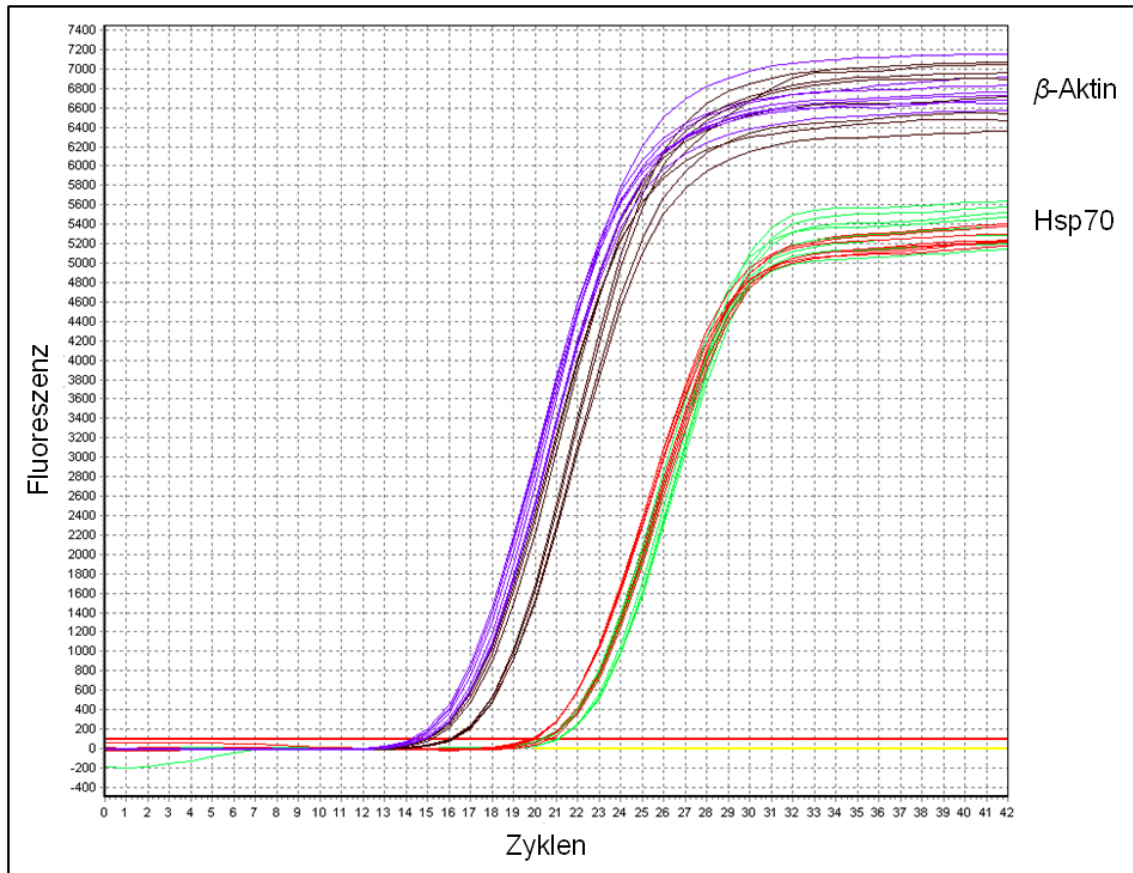
**Tabelle 6.8: Mittelwerte und Standardabweichungen der  $\Delta Cq$ -Werte, sowie der reziproken  $\Delta Cq$ -Werte, aus der relativen Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus Hämolymphe, nachdem die Insekten von infizierten Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen überführt wurden.**

	Zeit	<i>B. tabaci</i> Population											
		63				95				95-			
WmCSV	0 d	$\Delta Cq$	6,983	Stabw. $\Delta Cq$	3,322	$\Delta Cq$	9,123	Stabw. $\Delta Cq$	3,949	$\Delta Cq$	4,790	Stabw. $\Delta Cq$	5,697
	1 d		7,130		0,495		10,225		2,418		6,985		2,387
	2 d		8,880		0,891		10,803		2,867		10,393		1,128
	6 d		8,235		2,227		9,820		0,721		10,393		1,128
	0 d	Reziprok	0,175	Stabw. Rez.	0,104	Reziprok	0,142	Stabw. Rez.	0,102	Reziprok	0,054	Stabw. Rez.	0,064
	1 d		0,141		0,010		0,101		0,021		0,163		0,080
	2 d		0,114		0,011		0,098		0,026		0,098		0,026
	6 d		0,126		0,034		0,102		0,007		0,097		0,012
TYLCV	0 d	$\Delta Cq$	8,094	Stabw. $\Delta Cq$	3,521	$\Delta Cq$	6,363	Stabw. $\Delta Cq$	8,623	$\Delta Cq$	1,806	Stabw. $\Delta Cq$	4,038
	1 d		8,923		2,973		11,323		0,888		0,000		0,000
	2 d		7,290		2,438		9,255		2,425		0,725		1,776
	6 d		9,937		2,478		7,080		2,724		0,000		0,000
	0 d	Reziprok	0,141	Stabw. Rez.	0,054	Reziprok	0,123	Stabw. Rez.	0,054	Reziprok	0,022	Stabw. Rez.	0,050
	1 d		0,125		0,053		0,089		0,007		0,000		0,000
	2 d		0,151		0,058		0,112		0,029		0,038		0,094
	6 d		0,104		0,023		0,161		0,078		0,000		0,000

## 6.7 Quantifizierung von *hsp70* mRNA in virusfreien und virustragenden *B. tabaci* der Population 63 und 95

Abbildung 6.15 zeigt den Verlauf der Fluoreszenzkurven des *hsp70* mRNA- bzw. cDNA-Nachweises und des  $\beta$ -Aktin cDNA-Nachweises für ganze Individuen der Population 63. Da beide Nachweise parallel und unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, kann die Feststellung getroffen werden, dass das Gen für  $\beta$ -Aktin in *B. tabaci* 63 höher exprimiert ist als *hsp70*. Der Unterschied ist aber nicht so groß, dass er ein in Beziehung setzen verbieten würde.

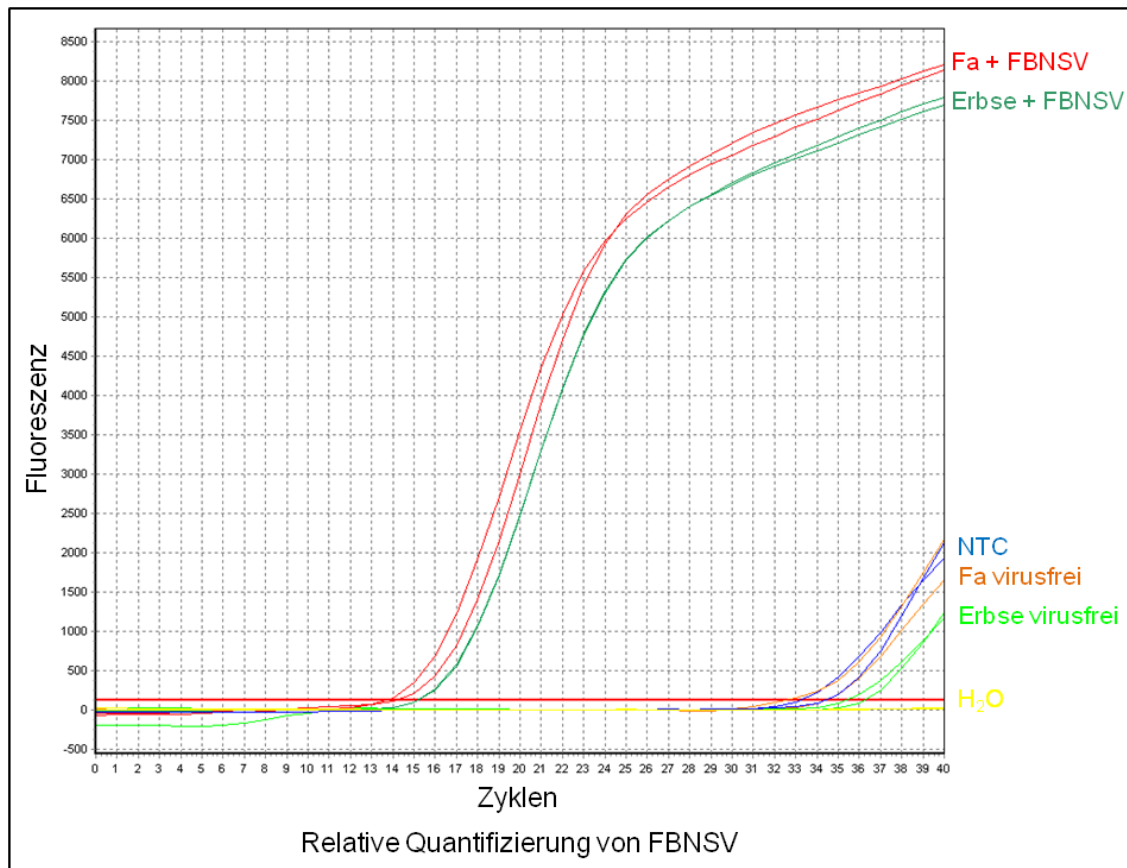
Durch unterschiedliche RNA-Mengen, die eingesetzt wurden, entsteht der Eindruck, dass sich die  $\beta$ -Aktin Expression zwischen virusfreien und virustragenden Individuen unterschied (violette und braune Kurven) und die *hsp70* Expression relativ konstant blieb (rote und grüne Kurven). Erst durch die Normierung aller Einzelexperimente auf die erhaltenen Werte für  $\beta$ -Aktin, und dem Vergleich mit einem zweiten Referenzgen (18S, nicht gezeigt), wurden die tatsächlichen Expressionsverhältnisse ersichtlich.



**Abbildung 6.15: Fluoreszenzkurven der relativen RT qPCR zum Nachweis der *hsp70* Expression in *B. tabaci* Population63 mit Hilfe des Referenzgens für *Beta*-Aktin.** Violette Kurven: *β-Aktin* mRNA-Nachweis in Gesamt-RNA aus Individuen, die zwei Tage an FBNSV infizierten Fababohnen gesaugt hatten. Braune Kurven: *β-Aktin* mRNA-Nachweis in Gesamt-RNA aus Individuen, die an virusfreien Fababohnen gesaugt hatten. Rote Kurven: *hsp70* mRNA-Nachweis in Gesamt-RNA aus Individuen, die zwei Tage an FBNSV infizierten Fababohnen gesaugt hatten. Grüne Kurven: *hsp70* mRNA-Nachweis in Gesamt-RNA aus Individuen, die an virusfreien Fababohnen gesaugt hatten. Gelbe Kurven: Negativkontrolle und Wasserkontrolle.

## 6.8 Relative Quantifizierung von FBNSV in Pflanzen

Abbildung 6.16 zeigt den Nachweis von FBNSV in Fababohnen und Erbsen (Blätter), die 20 Tage zuvor durch Erbsenläuse (*Acyrtosiphon pisum*) infiziert worden waren, anhand eines Fluoreszenzdiagramms der qPCR. Durch die Verwendung von SYBR-Green als interkalierender Farbstoff, wurden auch Primerdimere vom Detektor der PCR-Maschine erkannt. Deren Signale fielen jedoch, aufgrund ihres relativ späten Erscheinens über dem Schwellenwert, im Vergleich zu den Kurven der Virusdetektion, nicht ins Gewicht.



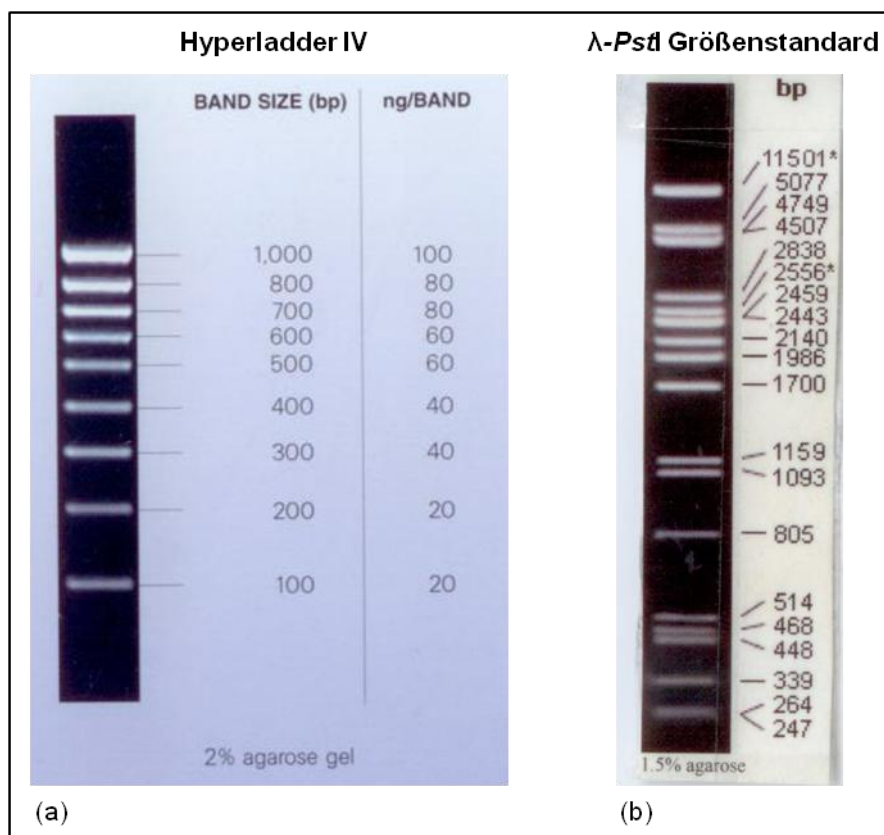
**Abbildung 6.16: SYBR-Green Fluoreszenzkurven zum Nachweis und zur relativen Quantifizierung von FBNSV in Fababohnen (Fa) und Erbsen mittels qPCR.** Jeweils wurden 50 ng DNA aus Blättern in die qPCR eingesetzt. Infizierte Fababohnen und Erbsen zeigen starke Signale des FBNSV-Nachweises.  $Cq_{\text{infizierte Fababohne}} = 13,99$ ;  $Cq_{\text{infizierte Erbse}} = 15,27$ . Die *non template control* (NTC) zeigt Primerdimere.  $Cq_{\text{NTC}} = 33,92$ . Virusfreie Fababohnen und Erbsen zeigen ebenfalls Primerdimere.  $Cq_{\text{virusfreie Fababohne}} = 33,58$ ;  $Cq_{\text{virusfreie Erbse}} = 35,95$ . Die Wasserkontrolle ( $H_2O$ ) bleibt unterhalb des Schwellenwertes.

Für einen Vergleich der FBNSV-Menge zwischen infizierten symptomatischen Fababohnen und Erbsen, wurde die unter Punkt 2.23.2 beschriebene Methode angewandt. Tabelle 6.9 zeigt die eingesetzten DNA-Mengen und die daraus resultierenden  $Cq$ -Werte. Sowie die berechneten  $[Cq-y]$ -Werte, deren Mittelwerte  $Cq_m$  und Standardabweichungen. Daraus ließ sich das Verhältnis des FBNSV-Gehalts zwischen Fababohne und Erbse ermitteln. Junge symptomatische Erbsen enthielten durchschnittlich  $2,71 \pm 1,89$  Mal weniger FBNSV in ihren Blättern, als Fababohnen, die den gleichen Zeitraum infiziert waren.

**Tabelle 6.9: Eingesetzte DNA-Mengen und erhaltende Cq-Werte der qPCR zur relativen Quantifizierung von FBNSV in Fababohnen- und Erbseblättern.**

Wirt	Eingesetzte DNA [ng]	Cq qPCR	[Cq-y] für 50 ng	Mittelwert	Standard-abweichung
Faba-bohne	50,0	13,99	13,99	14,31	0,40
	32,4	15,15	14,52		
	43,0	14,17	13,95		
	38,0	15,16	14,76		
Erbse	50,0	16,21	16,21	15,75	1,32
	40,4	16,72	16,41		
	45,0	17,74	16,59		
	46,6	13,89	13,79		

## 6.9 Größenstandards



**Abbildung 6.17: Größenstandards für die Agarosegelelektrophorese.**

(a) Hyperladder IV (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) im 2%igen Agarosegel (b) Spaltprodukt des Bakteriophagen  $\lambda$  mit Restriktionsenzym PstI im 1,5%igen Agarosegel. bp Basenpaare.

## 7 Literaturverzeichnis

**Aaziz R, Dinant RS, Epel BL** (2001): Plasmodesmata and plant cytoskeleton. *TRENDS in Plant Science*, 6(7): 326-330

**Accotto GP, Navas-Castillo J, Noris E, Moriones E, Louro D** (2000): Typing of Tomato Yellow Leaf Curl Viruses in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 106(2): 179-186(8)

**Agranovsky AA, Folimonov AS, Folimonova SY, Morozov SY, Schiemann J, Lesemann D, Atabekov JG** (1998): Beet yellows closterovirus HSP70-like protein mediates the cell-to-cell movement of a potexvirus transport-deficient mutant and a hordeivirus-based chimeric virus. *Journal of General Virology*, 79: 889–895

**Akad F, Dotan N, Czosnek H** (2004): Trapping of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) and other plant viruses with a GroEL homologue from the whitefly *Bemisia tabaci*. *Arch. Virol.*, 149: 1481–1497

**Akad F, Eybishtz A, Edelbaum D, Gorovits R, Dar-Issa O, Iraki N, Czosnek H** (2007): Making a friend from a foe: expressing a GroEL gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Arch. Virol.*, 152(7): 1323-1339

**Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter R** (2004): *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH, Seite: 859, 1360, 1368

**Alemndri V, De Barro P, Bejerman N, Argüello Caro EB, Dumón AD, Mattio MF, Rodriguez SM, Truoli G** (2012): Species within the *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) complex in soybean and bean crops in Argentina. *J Econ Entomol*, 105(1): 48-53

**Allingham PG, Kerlin RL, Tellam RL, Briscoe SJ, Standfast HA** (1992): Passage of host immunoglobulin across the mid-gut epithelium into the haemolymph of blood-fed buffalo flies *Haematobia irritans exigua*. *Journal of Insect Physiology*, 38(1): 9–13, 15–17

**Al-Musa A, Anfoka G, Al-Abdulat A, Misbeh S, Haj Ahmed F, Otri I** (2011): Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV): a serious disease threatening watermelon production in Jordan. *Virus Genes*, 43(1): 79-89

**Ambrozevicus LP, Calegario RF, Fontes EPB, Carvalho MG, Zerbini FM** (2002): Genetic diversity of begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 27: 372-377

**Ammar el-D, Gargani D, Lett JM, Peterschmitt M** (2009): Large accumulations of maize streak virus in the filter chamber and midgut cells of the leafhopper vector *Cicadulina mbila*. *Arch. Virol.*, 154(2): 255-262

**Anderson PK, Morales FJ** (2005): Whitefly and Whitefly-borne Viruses in the Tropics: Building a Knowledge Base for Global Action. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), CIAT publication No. 341, Kapitel 2.2, 2.6, 2.7

**Antignus Y, Cohen S** (1994): Complete Nucleotide Sequence of an Infectious Clone of a Mild Isolate of Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV). *Molecular Plant Pathology*, 84(7): 707-712

**Azzam O, Frazer J, de la Rosa D, Beaver JS, Ahlquist P, Maxwell DP** (1994): Whitefly transmission and efficient ssDNA accumulation of bean golden mosaic geminivirus require functional coat protein. *Virology*, 204(1): 289-296.

**Balagurumoorthy P, Adelstein SJ, Kassis AI** (2008): Method to eliminate linear DNA from mixture containing nickedcircular, supercoiled, and linear plasmid DNA. *Anal Biochem*, 381(1): 172–174

- Bananej K, Ahoonmanesh A, Kheyr-Pour A** (2002): Host Range of an Iranian Isolate of Watermelon Chlorotic Stunt Virus as Determined by Whitefly-mediated Inoculation and Agroinfection, and its Geographical Distribution. *J. Phytopathology*, 150: 423–430
- Bandla MD, Campbell LR, Ullman DE, Sherwood JL** (1998): Interaction of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) glycoproteins with a thrips midgut protein, a potential cellular receptor for TSWV. *Phytopathology*, 88: 98-104
- Banerjee S, Hess D, Majumder P, Roy PD, Das S** (2004): The Interactions of *Allium sativum* Leaf Agglutinin with a Chaperonin Group of Unique Receptor Protein Isolated from a Bacterial Endosymbiont of the Mustard Aphid. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(22): 23782–23789
- Baumann L, Thao ML, Funk CJ, Falk BW, Ng JCK, Baumann P** (2004): Sequence Analysis of DNA Fragments from the Genome of the Primary Endosymbiont of the Whitefly *Bemisia tabaci*. *Current Microbiology*, 48: 77–81
- Bedford ID, Briddon RW, Jones P, Alkaff N, Markham PG** (1994): Differentiation of three whitefly-transmitted geminiviruses from the Republic of Yemen. *European Journal of Plant Pathology*, 100: 243-257
- Behjatnia SAA, Dry IB, Rezaian MA** (1998): Identification of the replication-associated protein binding domain within the intergenic region of tomato leaf curl geminivirus. *Nucleic Acids Research*, 26(4): 925–931
- Bellows IS, Perring IM, Gill RJ, Headrick DH** (1994): Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 87(2): 195-206
- Berry SD, Fondong VN, Rey C, Rogan D, Fauquet CM, Brown JK** (2004): Molecular Evidence for Five Distinct *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) Geographic Haplotypes Associated with Cassava Plants in Sub-Saharan Africa. *Annals of the Entomological Society of America*, 97(4): 852-859
- Bird J** (1957): A whitefly transmitted mosaic of *Jatropha gossypifolia*. Technical Paper, Agricultural Experiment Station, Puerto Rico 22: 1-35
- Bird J, Maramorosch K** (1975): Tropical diseases of legumes. Acad. Press, London.
- Bird J, Maramorosch K** (1978): Viruses and virus diseases associated with whiteflies. *Advances in Virus Research* 22: 55-110
- Bisaro DM** (2006): Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology*, 344(1): 158-68
- Blanc S, Uzest M, Drucker M** (2011): New research horizons in vector-transmission of plant viruses. *Current Opinion in Microbiology*, 14: 483–491
- Böttcher B, Unseld S, Ceulemans H, Russell RB, Jeske H** (2004): Geminat Structures of African Cassava Mosaic Virus. *Journal of Virology*, 78(13): 6758–6765
- Bosco D, Mason G, Accotto GP** (2004): TYLCSV DNA, but not infectivity, can be transovarially inherited by the progeny of the whitefly vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Virology*, 323: 276–283
- Bouvaine S, Boonham N, Douglas AE** (2011): Interactions between a luteovirus and the GroEL chaperonin protein of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* of aphids. *Journal of General Virology*, 92: 1467–1474
- Bressan A, Watanabe S** (2011): Immunofluorescence localisation of Banana bunchy top virus (family Nanoviridae) within the aphid vector, *Pentalonia nigronervosa*, suggests a virus tropism distinct from aphid-transmitted luteoviruses. *Virus Research*, 155: 520–525

- Briddon RW, Pinner MS, Stanley J, Markham PG** (1990): Geminivirus coat protein replacement alters insect specificity. *Virology*, 177: 85-94
- Briddon RW, Stanley J** (2009): Geminiviridae. Wiley Online Library, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0000750.pub2/abstract>
- Brown JK** (2007a): The Bemisia tabaci complex: genetic and phenotypic variability drives begomovirus spread and virus diversification. Plant Disease Feature Story, (In: Stansly PA, Naranjo SE [2010]: Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest, Springer, New York, [<http://www.apsnet.org/online/feature/btabaci/>])
- Brown JK** (2007b): The Bemisia tabaci complex: genetic and phenotypic variation and relevance to TYLCV-vector interactions, 25-56, (In: Czosnek H [2007]: Tomato yellow leaf curl virus disease: management, molecular biology, breeding for resistance. Springer, New York)
- Brown JK, Bird J** (1992): Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Dis*, 76: 220-225
- Brown JK, Coats SA, Bedford ID, Markham PG, Bird J, Frohlich DR** (1995a): Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, Bemisia tabaci (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Biochem Genet*, 33(7-8): 205-214
- Brown JK, Frohlich DR, Rossell RC** (1995b): The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of Bemisia tabaci or a species complex? *Annual Review of Entomology*, 40: 511-534
- Brown JK, Lambert GM, Ghanim M, Czosnek H, Galbraith DW** (2005): Nuclear DNA content of the whitefly Bemisia tabaci (Aleyrodidae: Hemiptera) estimated by flow cytometry. *Bulletin of Entomological Research*, 95: 309-312
- Brown JK, Czosnek H** (2002): Whitefly transmission of plant viruses, *Advances in Botanical Research*, 36: 65-76 (Zitiert in: Thompson WMO [2011]: The Whitefly, Bemisia tabaci [Homoptera: Aleyroidae] Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants, Springer, New York, Seite: 50ff.)
- Bukau B, Horwich AL** (1998): The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell*, 92: 351-366
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT** (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, 55(4): 611-22
- Byrne DN, Bellows TS Jr** (1991): Whitefly Biology. *Annu. Rev. Entomol.*, 36: 431-57
- Caciagli P, Bosco D** (1997): Quantitation over time of tomato yellow leaf curl geminivirus DNA in its whitefly vector. *Phytopathology*, 87: 610-613
- Caciagli P, Bosco D, Al-Bitar L** (1995): Relationships of the Sardinian isolate of tomato yellow leaf curl geminivirus with its whitefly vector Bemisia tabaci Gen. *European Journal of Plant Pathology*, 101: 163-170
- Caciagli P, Piles VM, Marian D, Vecchiati M, Masenga V, Mason G, Falcioni T, Noris E** (2009): Virion stability is important for the circulative transmission of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus by Bemisia tabaci, but virion access to salivary glands does not guarantee transmissibility. *J. Virol.*, 83(11): 5784-5795
- Cai X, Woods KM, Upton SJ, Zhu G** (2005): Application of Quantitative Real-Time Reverse Transcription-PCR in Assessing Drug Efficacy against the Intracellular Pathogen Cryptosporidium parvum In Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11): 4437-4442
- Carabali A, Bellotti AC, Montoya-Lerma J, Cuellar ME** (2005): Adaptation of Bemisia tabaci biotype B (Gennadius) to cassava, Manihot esculenta (Crantz). *Crop Protection*, 24: 643-649



- Casartelli M, Cermenati G, Rodighiero S, Pennacchio F, Giordana B** (2008): A megalin-like receptor is involved in protein endocytosis in the midgut of an insect (*Bombyx mori*, Lepidoptera). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 295(4): R1290-1300
- Casartelli M, Corti P, Giovanna Leonardi M, Fiandra L, Burlini N, Pennacchio F, Giordana B** (2005): Absorption of albumin by the midgut of a lepidopteran larva. *J Insect Physiol*, 51(8): 933-940
- Chapman RF** (1998): *The Insects Structure and Function*. 4<sup>th</sup> edition, Cambridge University Press, United Kingdom
- Chen L-F, Gilbertson RL** (2009): Curtovirus–cucurbit interaction: Acquisition host plays a role in leafhopper transmission in a host dependent manner. *Phytopathology*, 99: 101-108
- Chiel E, Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Katzir N, Inbar M, Ghanim M** (2007): Biotype-dependent secondary symbiont communities in sympatric populations of *Bemisia tabaci*. *Bulletin of Entomological Research*, 97: 407–413
- Chiel E, Zchori-Fein E, Inbar M, Gottlieb Y, Adachi-Hagimori T, Kelly SE, Asplen MK, Hunter MS** (2009): Almost There: Transmission Routes of Bacterial Symbionts between Trophic Levels. *PLoS ONE*, 4(3): e4767
- Chowda-Reddy RV, Achenjang F, Felton C, Etarock MT, Anangfac MT, Nugent P, Fondong VN** (2008): Role of a geminivirus AV2 protein putative protein kinase C motif on subcellular localization and pathogenicity. *Virus Res*, 135(1): 115-124
- Chu D, Gao CS, De Barro P, Zhang YJ, Wan FH, Khan IA** (2011): Further insights into the strange role of bacterial endosymbionts in whitefly, *Bemisia tabaci*: comparison of secondary symbionts from biotypes B and Q in China. *Bull Entomol Res*, 101(4): 477-86
- Cicero JM, Brown JK** (2011a): Functional Anatomy of Whitefly Organs Associated with Squash Leaf Curl Virus (Geminiviridae: Begomovirus) Transmission by the B Biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 104(2): 261-279
- Cicero JM, Brown JK** (2011b): Anatomy of Accessory Salivary Glands of the Whitefly *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) and Correlations to Begomovirus Transmission. *Annals of the Entomological Society of America*, 104(2): 280-286
- Cicero JM, Hiebert E, Webb SE** (1995): The alimentary canal of *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes abutilonea* (Homoptera, Sternorrhynchi): histology, ultrastructure and correlations to function. *Zoomorphology*, 115(1): 31-39
- Coats SA, Brown JK, Hendrix DL** (1994): Biochemical Characterization of Biotype-Specific Esterases in the Whitefly, *Bemisia tabaci* Genn (Homoptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 24(7): 723-728
- Cock MJW** (1986): *Bemisia tabaci* - a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography. C.A.B., Ascot, United Kingdom
- Cohen S, Duffus JE, Liu HY** (1989): Acquisition, Interference, and Retention of Cucurbit Leaf Curl Viruses in Whiteflies. *The American Phytopathological Society*, 79(1): 109-113
- Cohen S, Duffus JE, Liu HY** (1992): A New *Bemisia tabaci* Biotype in the Southwestern United States and its Role in Silverleaf of Squash and Transmission of Lettuce Infectious Yellows Virus. *Phytopathology*, 82(1): 86-90
- Cohen S, Nitzany FE** (1966): Transmission and host range of the tomato yellow leaf curl virus. *Phytopathology*, 56: 1127–1131.

- Cole KD, Tellez CM, Blakesley RW** (2000): Separation of different physical forms of plasmid DNA using a combination of low electric field strength and flow in porous media: effect of different field gradients and porosity of the media. *Electrophoresis*, 21(5): 1010-1017
- Costa HS, Brown JK, Sivasupramaniam S, Bird J** (1993): Regional distribution, insecticide resistance, and reciprocal crosses between the A and B biotypes of *Bemisia tabaci*. *International Journal of Tropical Insect Science*, 14(2): 255-266
- Costa HS, Westcot DM, Ullman DE, Rosell RC, Brown JK, Johnson MW** (1996): Virus-like particles in the mycetocytes of the sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera, Aleyrodidae). *J Invertebr Pathol* 67(2): 183-186
- Crouch EA, Passarelli AL** (2005): Effects of baculovirus transactivators IE-1 and IE-2 on the *Drosophila* heat shock 70 promoter in two insect cell lines. *Arch Virol*, 150(8): 1563-1578
- Crowder DW, Horowitz AR, De Barro PJ, Liu S-S, Showalter AM, Kontsedalov S, Khasdan V, Shargal A, Liu J, Carrière Y** (2010): Mating behaviour, life history and adaptation to insecticides determine species exclusion between whiteflies. *Journal of Animal Ecology*, 79: 563–570
- Czosnek H, Ghanim M, Ghanim M** (2002): The circulative pathway of begomoviruses in the whitefly vector *Bemisia tabaci* - insights from studies with Tomato yellow leaf curl virus. *Ann. appl. Biol.*, 140: 215-231
- Czosnek H, Laterrot H** (1997): A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Arch Virol*, 142(7): 1391-1406
- De Barro PJ** (2005): Genetic structure of the whitefly *Bemisia tabaci* in the Asia–Pacific region revealed using microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 14: 3695–3718
- De Barro PJ, Driver F, Trueman JWH, Curran J** (2000): Phylogenetic Relationships of World Populations of *Bemisia tabaci* (Gennadius) Using Ribosomal ITS1. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(1): 29–36
- De Barro PJ, Liebregts W, Carver M** (1998): Distribution and identity of biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) in member countries of the Secretariat of the Pacific Community. *Australian Journal of Entomology*, 37: 214-218
- De Barro PJ, Liu SS, Boykin LM, Dinsdale AB** (2011): *Bemisia tabaci*: a statement of species status. *Annu Rev Entomol*, 56: 1-19
- De Barro PJ, Scott KD, Graham GC, Lange CL, Schutze MK** (2003): Isolation and characterization of microsatellite loci in *Bemisia tabaci*. *Molecular Ecology Notes*, 3: 40-43
- De Barro PJ, Trueman JWH, Frohlich DR** (2005): *Bemisia argentifolii* is a race of *B. tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), the molecular genetic differentiation of *B. tabaci* populations around the world. *Bulletin of Entomological Research*, 95(3): 193–203
- De Beus MD, Doyle SM, Teschke CM** (2000): GroEL binds a late folding intermediate of phage P22 coat protein. *Cell Stress & Chaperones*, 5(3): 163–172
- Díaz-Pendón JA, Cañizares MC, Moriones E, Bejarano ER, Czosnek H, Navas-Castillo J** (2010): Tomato yellow leaf curl viruses: ménage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector. *Mol Plant Pathol*, 11(4): 441-450
- Dinsdale A, Cook L, Riginos C, Buckley YM, De Barro P** (2010): Refined Global Analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) Mitochondrial Cytochrome Oxidase 1 to Identify Species Level Genetic Boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(2): 196-208

- Dittrich V, Hassan SO, Ernst G** (1985): Sudanese cotton and the whitefly: a case study of the emergence of a new primary pest. *Crop Protection*, 4(2): 161–176
- Elbaz M, Weiser M, Morin S** (2011): Asymmetry in thermal tolerance trade-offs between the B and Q sibling species of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *J Evol Biol*, 24(5): 1099-1109
- Elmer JS, Brand L, Sunter G, Gardiner WE, Bisaro DM, Rogers SG** (1988): Genetic analysis of the tomato golden mosaic virus H. The product of the ALI coding sequence is required for replication. *Nucleic Acids Research*, 16(14): 7043-7060
- Elwazzan IFF** (2006): Translocation of Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) in its insect vector *Bemisia tabaci* (Genn.). Dissertation, Naturwissenschaftliche Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
- Everett KDE, Thao ML, Horn M, Dyszynski GE, Baumann P** (2005): Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts 'Candidatus Fritschea bemisiae' strain Falk and 'Candidatus Fritschea eriococci' strain Elm. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55: 1581–1587
- Faostat** (2012): FAO Statistics Division, Rom, Italien
- Fauna Europaea** (2012): Stichwort Hemiptera, [http://www.faunaeur.org/full\\_results.php?id=12353](http://www.faunaeur.org/full_results.php?id=12353)
- Fazeli R, Heydarnejad J, Massumi H, Shaabani M, Varsani A** (2009): Genetic diversity and distribution of tomato-infecting begomoviruses in Iran. *Virus Genes*, 38(2): 311-319
- Fereres A, Moreno A** (2009): Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Res*, 141(2): 158-168
- Ferreira RS, Moraes JC, Antunes CS** (2011): Silicon influence on resistance induction against *Bemisia tabaci* biotype B (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae) and on vegetative development in two soybean cultivars. *Neotrop Entomol*, 40(4): 495-500
- Filichkin SA, Brumfield S, Filichkin TP, Young MJ** (1997): In Vitro Interactions of the Aphid Endosymbiotic SymL Chaperonin with Barley Yellow Dwarf Virus. *Journal of Virology*, 71(1): 569–577
- Förster T** (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. Physik*, 6(2): 55-75
- Fondong VN, Reddy RVC, Lu C, Hankoua B, Felton C, Czymmek K, Achenjang F** (2007): The Consensus N-Myristoylation Motif of a Geminivirus AC4 Protein Is Required for Membrane Binding and Pathogenicity. *MPMI*, 20(4): 380–391
- Fontes EPB, Eagle PA, Sipe PS, Luckow VA, Hanley-Bowdoin L** (1994a): Interaction between a Geminivirus Replication Protein and Origin DNA Is Essential for Viral Replication. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(11): 8459-8465
- Fontes EPB, Gladfelter HJ, Schaffer RL, Petty ITD, Hanley-Bowdoin L** (1994b): Geminivirus Replication Origins Have a Modular Organization. *The Plant Cell*, 6: 405-416
- Fontes EPB, Luckow VA, Hanley-Bowdoin L** (1992): A Geminivirus Replication Protein Is a Sequence-Specific DNA Binding Protein. *The Plant Cell*, 4: 597-608
- Francki RI, Hatta T, Boccardo G, Randles JW** (1980): The composition of Chloris striate mosaic virus, A geminivirus. *Virology*, 101(1): 233-241
- Franz A, Makkouk KM, Vetten HJ** (1998): Acquisition, Retention and Transmission of Faba Bean Necrotic Yellows Virus by Two of its Aphid Vectors, *Aphis craccivora* (Koch) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *J. Phytopathology*, 146: 347-355

- Frohlich DR, Torres-Jerez I, Bedford ID, Markham PG, Brown JK** (1999): A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 8: 1683–1691
- Froissart R, Doumayrou J, Vuillaume F, Alizon S, Michalakakis Y** (2010): The virulence-transmission trade-off in vector-borne plant viruses: a review of (non-)existing studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 365(1548): 1907-1918
- Fuentes A, Ramos PL, Fiallo E, Callard D, Sánchez Y, Peral R, Rodríguez R, Pujol M** (2006): Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Res*, 15(3): 291-304
- Gad AM, Hassan MM, el Said S, Moussa MI, Wood OL** (1987): Rift Valley fever virus transmission by different Egyptian mosquito species. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81(4): 694-698
- Gadelseed AMA** (2006): Studies on the genetic diversity of whitefly *Bemisia tabaci* (Genn.) and the molecular basis of Begomovirus transmission. Dissertation, University of Gezira, Sudan
- Galvão RM, Mariano AC, Luz DF, Alfenas PF, Andrade EC, Zerbini FM, Almeida MR, Fontes EPB** (2003): A naturally occurring recombinant DNA-A of a typical bipartite begomovirus does not require the cognate DNA-B to infect *Nicotiana benthamiana* systemically. *Journal of General Virology*, 84: 715–726
- Gennadius P** (1889): Disease of the tobacco plantations in the Trikonía. The Aleyrodid of Tobacco, *Ellenike Ga.*, 5: 1-3
- Ghanim M, Brumin M, Popovski S** (2009): A simple, rapid and inexpensive method for localization of Tomato yellow leaf curl virus and Potato leafroll virus in plant and insect vectors. *Journal of Virological Methods*, 159: 311–314
- Ghanim M, Czosnek H** (2000): Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus (TYLCV-Is) Is Transmitted among Whiteflies (*Bemisia tabaci*) in a Sex-Related Manner. *Journal of Virology*, 74(10): 4738–4745
- Ghanim M, Morin S, Czosnek H** (2001a): Rate of Tomato yellow leaf curl virus translocation in the circulative transmission pathway of its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytopathology*, 91: 188-196
- Ghanim M, Morin S, Zeidan M, Czosnek H** (1998): Evidence for transovarial transmission of tomato yellow leaf curl virus by its vector, the whitefly *Bemisia tabaci*. *Virology*, 240(2): 295-303
- Ghanim M, Rosell RC, Campbell LR, Czosnek H, Brown JK, Ullman DE** (2001b): Digestive, Salivary, and Reproductive Organs of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) B Type. *Journal of Morphology*, 248: 22-40
- Gildow FE, Shah DA, Sackett WM, Butzler T, Nault BA, Fleischer, SJ** (2008): Transmission efficiency of Cucumber mosaic virus by aphids associated with virus epidemics in snap bean. *Phytopathology*, 98: 1233-1241
- Götz M, Popovski S, Kollenberg M, Gorovits R, Brown JK, Cicero JM, Czosnek H, Winter S, Ghanim M** (2012): Implication of *Bemisia tabaci* Heat Shock Protein 70 in Begomovirus-Whitefly Interactions. *J Virol* 86(24): 13241-13252
- Gonzalez RA, Goldman GE, Natwick ET, Rosenberg HR, Grieshop JI, Sutter SR, Funakoshi T, Davila-Garcia S** (1992): Whitefly invasion in Imperial Valley costs growers, workers millions in losses. *California Agriculture*, 46(5): 7-8
- Goodman RM** (1977): Single-stranded DNA genome in a whitefly-transmitted plant virus. *Virology*, 83: 171–179

- Gorovits R, Akad F, Beery H, Vidavsky F, Mahadav A, Czosnek H** (2007): Expression of Stress-Response Proteins Upon Whitefly-Mediated Inoculation of Tomato yellow leaf curl virus in Susceptible and Resistant Tomato Plants. *MPMI*, 20(11): 1376–1383
- Gorovits R, Czosnek H** (2008): Expression of stress gene networks in tomato lines susceptible and resistant to Tomato yellow leaf curl virus in response to abiotic stresses. *Plant Physiol Biochem*, 46(4): 482-492
- Gottlieb Y, Ghanim M, Chiel E, Gerling D, Portnoy V, Steinberg S, Tzuri G, Horowitz AR, Belausov E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Gershon M, Gal S, Katzir N, Zchori-Fein E** (2006): Identification and localization of a Rickettsia sp. in Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae). *Appl Environ Microbiol*, 72(5): 3646-3652
- Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N, Kontsedalov S, Skaljic M, Brumin M, Sobol I, Czosnek H, Vavre F, Fleury F, Ghanim M** (2010): The transmission efficiency of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly Bemisia tabaci is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *J Virol*, 84(18): 9310-9317
- Greathead AH** (1986): Host Plants. (In: Cock MJW [1986]: Bemisia tabaci - a literature survey on the cotton whitefly with an annotated bibliography. CAB International Institute of Biological Control, Ascot, UK, Kapitel 3: 17-25)
- Grigoras I, Timchenko T, Katul L, Grande-Pérez A, Vetten HJ, Gronenborn B** (2009): Reconstitution of authentic nanovirus from multiple cloned DNAs. *J Virol*, 83(20): 10778-10787
- Grigoras I, Timchenko T, Grande-Pérez A, Katul L, Vetten HJ, Gronenborn B** (2010a): High variability and rapid evolution of a nanovirus. *J Virol*, 84(18): 9105-9117
- Grigoras I, Vetten H-J, Sultanova NF, Winter S, Huseynova IM, Mamedov AC, Kheyr-Pour A, Gronenborn B** (2010b): Single-Stranded DNA Plant Viruses in Azerbaijan, the State of the Art. *Proceedings of ANAS (Biological Sciences)*, 65(5-6): 152-157
- Gunning RV, Byrne F, Conde BD, Connelly MI, Hergstrom K, Devonshire AL** (1995): First Report of B-Biotype Bemisia tabaci (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) in Australia. *J. Aust. ent. Soc.*, 34: 116
- Guo JY, Dong SZ, Yang XL, Cheng L, Wan FH, Liu SS, Zhou XP, Ye GY** (2012): Enhanced vitellogenesis in a whitefly via feeding on a begomovirus-infected plant. *PLoS One*, 7(8): e43567
- Hanley-Bowdoin L, Settledge SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D** (2000): Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35(2): 105-140
- Harris KF, Esbroeck ZP-V, Duffus JE** (1996): Morphology of the sweet potato whitefly, Bemisia tabaci (Homoptera, Aleyrodidae) relative to virus transmission. *Zoomorphology*, 116: 143–156
- Heddi A, Grenier AM, Khatchadourian C, Charles H, Nardon P** (1999): Four intracellular genomes direct weevil biology: nuclear, mitochondrial, principal endosymbiont, and Wolbachia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(12): 6814-6819
- Höfer P, Bedford ID, Markham PG, Jeske H, Frischmuth T** (1997): Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate. *Virology*, 236(2): 288-295
- Höhfeld J, Douglas M, Patterson C** (2001): From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO*, 2(10): 885-890

- Höhnle M, Höfer P, Bedford ID, Briddon RW, Markham PG, Frischmuth T** (2001): Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible Abutilon mosaic virus isolate. *Virology*, 290(1): 164-171
- Hogenhout SA, van der Wilk F, Verbeek M, Goldbach RW, van den Heuvel JF** (1998): Potato leafroll virus binds to the equatorial domain of the aphid endosymbiotic GroEL homolog. *J Virol*, 72(1): 358-365
- Hogenhout SA, van der Wilk F, Verbeek M, Goldbach RW, van den Heuvel JF** (2000): Identifying the determinants in the equatorial domain of Buchnera GroEL implicated in binding Potato leafroll virus. *J Virol*, 74(10): 4541-4548
- Hoogstraten RA, Hanson SF, Maxwell DP** (1996): Mutational Analysis of the Putative Nicking Motive in the Replication-Associated Protein (AC1) of Bean Golden Mosaic Geminivirus. *MPMI*, 9(7): 594-599
- Hu J, De Barro P, Zhao H, Wang J, Nardi F, Liu SS** (2011): An extensive field survey combined with a phylogenetic analysis reveals rapid and widespread invasion of two alien whiteflies in China. *PLoS One*, 6(1): e16061
- Hull R** (2004): *Matthews' Plant Virology*. Elsevier, San Diego, USA, Seite: 28, 180
- Hunter WB, Hiebert E, Webb SE, Tsai JH, Polston JE** (1998): Location of geminiviruses in the whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Plant Dis*, 82: 1147-1151
- Hwang DJ, Tumer NE, Wilson TM** (1998): Chaperone protein GrpE and the GroEL/GroES complex promote the correct folding of tobacco mosaic virus coat protein for ribonucleocapsid assembly in vivo. *Arch Virol*, 143(11): 2203-2214
- Idris AM, Brown JK** (2005): Evidence for interspecific-recombination for three monopartite begomoviral genomes associated with the tomato leaf curl disease from central Sudan. *Arch Virol*, 150(5): 1003-1012
- Jiang YX, de Blas C, Barrios L, Fereres A** (2000): Correlation Between Whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) Feeding Behavior and Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *Annals of the Entomological Society of America*, 93(3): 573-579
- Jones P, Sattar MHA and Alkaff N** (1988): The incidence of virus disease in watermelon and sweetmelon crops in the Peoples Democratic Republic of Yemen and its impact on cropping policy. *Aspects of Applied Biology*, 17: 203-207
- Jupin I, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborn B** (1994): Movement of tomato yellow leaf curl geminivirus (TYLCV): involvement of the protein encoded by ORF C4. *Virology*, 204(1): 82-90
- Khan AJ, Akhtar S, Briddon RW, Ammara U, Al-Matrooshi AM, Mansoor S** (2012): Complete nucleotide sequence of watermelon chlorotic stunt virus originating from Oman. *Viruses*, 4(7): 1169-1181
- Kheyr-Pour A, Bananej K, Dafalla GA, Caciagli P, Noris E, Ahoonmanesh A, Lecoq H, Gronenborn B** (2000): Watermelon chlorotic stunt virus from the Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a whitefly-transmission determinant. *Phytopathology*, 90: 629-635
- Kheyr-Pour A, Bendahmane M, Matzeit V, Accotto GP, Crespi S, Gronenborn B** (1991): Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. *Nucleic Acids Res*, 19(24): 6763-6769
- Kheyr-Pour A, Dafalla GA, Lecoq H, Gronenborn B** (1997): Molecular analysis of Watermelon chlorotic stunt virus (WCSV) from Sudan. *Phytoparasitica*, 25(1): 78-78

- Kirk AA, Lacey LA, Brown JK, Ciomperlik MA, Goolsby JA, Vacek DC, Wendel LE, Napompeth B** (2000): Variation in the *Bemisia tabaci* s. l. species complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies leading to successful biological control of *Bemisia* biotype B in the USA. *Bull Entomol Res*, 90(4): 317-327
- Krijnse-Locker J, Ericsson M, Rottier PJ, Griffiths G** (1994): Characterization of the budding compartment of mouse hepatitis virus: evidence that transport from the RER to the Golgi complex requires only one vesicular transport step. *J Cell Biol*, 124(1-2): 55-70
- Lapidot M, Friedmann M** (2002): Breeding for resistance to whitefly-transmitted geminiviruses. *Annals of Applied Biology*, 140(2): 109–127
- Laufs J, Traut W, Heyraud F, Matzeit V, Rogers SG, Schell J, Gronenborn B** (1995): In vitro cleavage and joining at the viral origin of replication by the replication initiator protein of tomato yellow leaf curl virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 3879-3883
- Lecoq H, Dafalla G, Desbiez C, Wipf-Scheibel C, Kheyr-Pour A** (2003): A 10-year survey (1993-2002) of cucurbit viruses in Sudan. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 110(1): 68-69
- Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJ, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J** (2010): The spread of tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathog*, 6(10): e1001164
- Levy A, Czosnek H** (2003): The DNA-B of the non-phloem-limited bean dwarf mosaic virus (BDMV) is able to move the phloem-limited Abutilon mosaic virus (AbMV) out of the phloem, but DNA-B of AbMV is unable to confine BDMV to the phloem. *Plant Mol Biol*, 53(6): 789-803
- Li X, Degain BA, Harpold VS, Marçon PG, Nichols RL, Fournier AJ, Naranjo SE, Palumbo JC, Ellsworth PC** (2012): Baseline susceptibilities of B- and Q-biotype *Bemisia tabaci* to anthranilic diamides in Arizona. *Pest Manag Sci*, 68(1): 83-91
- Liang P, Tian YA, Biondi A, Desneux N, Gao XW** (2012): Short-term and transgenerational effects of the neonicotinoid nitenpyram on susceptibility to insecticides in two whitefly species. *Ecotoxicology*, 21(7): 1889-1898
- Liu SS, Colvin J, De Barro PJ** (2012): Species Concepts as Applied to the Whitefly *Bemisia tabaci* Systematics: How Many Species Are There? *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 176-186
- Liu SS, De Barro PJ, Xu J, Luan JB, Zang LS, Ruan YM, Wan FH** (2007): Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science*, 318(5857): 1769-1772
- Lotrakul P, Valverde RA, Clark CA, Fauquet CM** (2003): Properties of a Begomovirus isolated from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] infected with Sweet potato leaf curl virus. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 21: 128-136
- Lottspeich F, Zorb H** (1998): *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Lü ZC, Wan FH** (2011): Using double-stranded RNA to explore the role of heat shock protein genes in heat tolerance in *Bemisia tabaci* (Gennadius). *J Exp Biol*, 214(5): 764-769
- Luna AP, Morilla G, Voinnet O, Bejarano ER** (2012): Functional analysis of gene-silencing suppressors from Tomato yellow leaf curl disease viruses. *Mol Plant Microbe Interact*, 25(10): 1294-1306
- Mackay IM** (2004): Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, 10: 190–212

- Madigan MT, Martinko JM** (2006): Brock Mikrobiologie, 11. überarbeitete Auflage, Pearson Studium, München, Seite: 299-302, 541-542
- Markham PG, Bedford ID, Liu S, Pinner MS** (1994): The Transmission of Geminiviruses by *Bemisia tabaci*. *Pestic. Sci.*, 42: 123-128
- Martin JH, Mifsud D, Rapisarda C** (2000): The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean Basin. *Bulletin of Entomological Research*, 90: 407–448
- McKenzie CL, Bethke JA, Byrne FJ, Chamberlin JR, Dennehy TJ, Dickey AM, Gilrein D, Hall PM, Ludwig S, Oetting RD, Osborne LS, Schmale L, Shatters RG Jr** (2012): Distribution of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in North America after the Q invasion. *J Econ Entomol*, 105(3): 753-766
- Medina V, Pinner MS, Bedford ID, Achon MA, Gemeno C, Markham PG** (2006): Immunolocalization of Tomato yellow leaf curl sardinia virus in natural host plants and its vector *Bemisia tabaci*. *Journal of Plant Pathology*, 88(3): 299-308
- Mehta P, Wyman JA, Nakhla MK, Maxwell DP** (1994): Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Geminiviruses by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal of Economic Entomology*, 87(5): 1291-1297
- Morin S, Ghanim M, Zeidan M, Czosnek H, Verbeek M, van den Heuvel JF** (1999): A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of the whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 256(1): 75-84
- Morin S, Ghanim M, Sobol I, Czosnek H** (2000): The GroEL protein of the whitefly *Bemisia tabaci* interacts with the coat protein of transmissible and nontransmissible begomoviruses in the yeast two-hybrid system. *Virology*, 276(2): 404-416
- Moriones E, Navas-Castillo J** (2000): Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Res*, 71(1-2): 123-134
- Mubin M, Mansoor S, Hussain M, Zafar Y** (2007): Silencing of the AV2 gene by antisense RNA protects transgenic plants against a bipartite begomovirus. *Virology*, 4(10)
- Muñiz M** (2000): Host suitability of two biotypes of *Bemisia tabaci* on some common weeds. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95: 63–70
- Muñiz Y, Granier M, Caruth C, Umaharan P, Marchal C, Pavis C, Wicker E, Martínez Y, Peterschmitt M** (2011): Extensive settlement of the invasive MEAM1 population of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) in the Caribbean and rare detection of indigenous populations. *Environ Entomol*, 40(5): 989-998
- Navot N, Pichersky E, Zeidan M, Zamir D, Czosnek H** (1991): Tomato Yellow Leaf Curl Virus: A Whitefly-Transmitted Geminivirus with a Single Genomic Component. *Virology*, 185: 151-161
- Nollen EAA, Morimoto RI** (2002): Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*, 115: 2809-2816
- Noris E, Accotto GP, Tavazza R, Brunetti A, Crespi S, Tavazza M** (1996a): Resistance to tomato yellow leaf curl geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology*, 224(1): 130-138
- Noris E, Jupin I, Accotto GP, Gronenborn B** (1996b): DNA-binding activity of the C2 protein of tomato yellow leaf curl geminivirus. *Virology*, 217(2): 607-612
- Ohnesorge S, Bejarano ER** (2009): Begomovirus coat protein interacts with a small heat-shock protein of its transmission vector (*Bemisia tabaci*). *Insect Mol Biol*, 18(6): 693-703



**Orilio AF, Navas-Castillo J** (2009): The complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus tomato infectious chlorosis virus: isolates from North America and Europe are essentially identical. *Arch Virol*, 154(4): 683-687

**Pan H, Chu D, Yan W, Su Q, Liu B, Wang S, Wu Q, Xie W, Jiao X, Li R, Yang N, Yang X, Xu B, Brown JK, Zhou X, Zhang Y** (2012a): Rapid spread of tomato yellow leaf curl virus in China is aided differentially by two invasive whiteflies. *PLoS One*, 7(4): e34817

**Pan H, Li X, Ge D, Wang S, Wu Q, Xie W, Jiao X, Chu D, Liu B, Xu B, Zhang Y** (2012b): Factors affecting population dynamics of maternally transmitted endosymbionts in *Bemisia tabaci*. *PLoS One*, 7(2): e30760

**Pan H, Li X, Zhang Y** (2012c): Sex affects the infection frequencies of symbionts in *Bemisia tabaci*. *Commun Integr Biol*, 5(4): 337-339

**Papayiannis LC, Iacovides TA, Katis NI, Brown JK** (2010): Differentiation of Tomato yellow leaf curl virus and Tomato yellow leaf curl Sardinia virus using real-time TaqMan PCR. *J Virol Methods*, 165(2): 238-245

**Pascual S, Callejas C** (2004): Intra- and interspecific competition between biotypes B and Q of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) from Spain. *Bulletin of Entomological Research*, 94: 369–375

**Peiffer ML, Gildow FE, Gray SM** (1997): Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *J Gen Virol*, 78(3): 495-503

**Péréfarres F, Hoareau M, Chiroleu F, Reynaud B, Dintinger J, Lett JM** (2011): A novel synthetic quantification standard including virus and internal report targets: application for the detection and quantification of emerging begomoviruses on tomato. *Virol J*, 8(389)

**Peremyslov VV, Hagiwara Y, Dolja VV** (1999): HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26): 14771-14776

**Peretz Y, Eybishtz A, Sela I** (2011): Silencing of ORFs C2 and C4 of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Engenders Resistant or Tolerant Plants. *Open Virol J*, 5: 141-147

**Peretz Y, Mozes-Koch R, Akad F, Tanne E, Czosnek H, Sela I** (2007): A Universal Expression/Silencing Vector in Plants. *Plant Physiol*, 145(4): 1251–1263

**Perring TM** (2001): The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protection*, 20: 725–737

**Perring TM, Cooper AD, Rodriguez RJ, Farrar CA, Bellows TS Jr** (1993): Identification of a whitefly species by genomic and behavioral studies. *Science*, 259(5091): 74-77

**Pfaffl MW** (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2002-2007

**Pico B, Diez MJ, Nuez F** (1996): Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus: a review. *Scientia horticultrae*, 67(3-4): 151-196

**Polston JE, Anderson PK** (1997): The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, 81(12): 1358-1369

**Pooma W, Petty IT** (1996): Tomato golden mosaic virus open reading frame AL4 is genetically distinct from its C4 analogue in monopartite geminiviruses. *J Gen Virol*, 77(8): 1947-1951

- Power AG** (2000): Insect transmission of plant viruses: a constraint on virus variability. *Curr Opin Plant Biol*, 3(4): 336-340
- Puchtler H, Waldrop FS, Conner HM, Terry MS** (1968): Carnoy fixation: practical and theoretical considerations. *Histochemie*, 16(4): 361-371
- Pusag JC, Hemayet Jahan SM, Lee KS, Lee S, Lee KY** (2012): Upregulation of temperature susceptibility in *Bemisia tabaci* upon acquisition of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *J Insect Physiol*, 58(10): 1343-1348
- Rahman J, Karjee S, Mukherjee SK** (2012): MYMIV-AC2, a geminiviral RNAi suppressor protein, has potential to increase the transgene expression. *Appl Biochem Biotechnol*, 167(4): 758-775
- Rana VS, Singh ST, Priya NG, Kumar J, Rajagopal R** (2012): Arsenophonus GroEL interacts with CLCuV and is localized in midgut and salivary gland of whitefly *B. tabaci*. *PLoS One*, 7(8): e42168
- Rawer D** (2006): Real-Time PCR: Optimierung und Evaluation, Etablierung von Housekeeping-Genen und die Expressionsanalyse bei Fallotscher Tetralogie. Dissertation, Fachbereich der Medizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Rochester DE, Kositratana W, Beachy RN** (1990): Systemic movement and symptom production following agroinoculation with a single DNA of tomato yellow leaf curl geminivirus (Thailand). *Virology*, 178(2): 520-526
- Roditakis E, Roditakis NE, Tsagkarakou A** (2005): Insecticide resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) populations from Crete. *Pest Manag Sci*, 61(6): 577-582
- Rojas MR, Jiang H, Salati R, Xoconostle-Cázares B, Sudarshana MR, Lucas WJ, Gilbertson RL** (2001): Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, 291(1): 110-125
- Rosell RC, Bedford ID, Frohlich DR, Gill RJ, Brown JK, Markham PG** (1997): Analysis of morphological variation in distinct populations of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 90(5): 575-589
- Rosell RC, Davidson EW, Jancovich JK, Hendrix DL, Brown JK** (2003): Size Limitations in the Filter Chamber and Digestive Tract of Nymphal and Adult *Bemisia tabaci* Whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 96(4): 544-552
- Rosell RC, Torres-Jerez I, Brown JK** (1999): Tracing the geminivirus-whitefly transmission pathway by polymerase chain reaction in whitefly extracts, saliva, hemolymph, and honeydew. *Phytopathology*, 89(3): 239-246
- Rotenberg D, Krishna Kumar NK, Ullman DE, Montero-Astúa M, Willis DK, German TL, Whitfield AE** (2009): Variation in Tomato spotted wilt virus titer in *Frankliniella occidentalis* and its association with frequency of transmission. *Phytopathology*, 99(4): 404-410
- Rubinstein G, Czosnek H** (1997): Long-term association of tomato yellow leaf curl virus with its whitefly vector *Bemisia tabaci*: effect on the insect transmission capacity, longevity and fecundity. *J Gen Virol*, 78(10): 2683-2689
- Ruiz L, Janssen D, Velasco L, Segundo E, Cuadrado IM** (2002): Quantitation of cucurbit yellow stunting disorder virus in *Bemisia tabaci* (Genn.) using digoxigenin-labelled hybridisation probes. *J Virol Methods*, 101(1-2): 95-103
- Sanderfoot AA, Lazarowitz SG** (1996): Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite geminivirus movement proteins. *Trends Cell Biol*, 6(9): 353-358

- Saunders K, Bedford ID, Stanley J** (2002): Adaptation from whitefly to leafhopper transmission of an autonomously replicating nanovirus-like DNA component associated with ageratum yellow vein disease. *J Gen Virol*, 83(4): 907-913
- Shahjahan RM, Hughes KJ, Leopold RA, DeVault JD** (1995): Lower incubation temperature increases yield of insect genomic DNA isolated by the CTAB method. *Biotechniques*, 19(3): 332-334
- Shi LX, Theg SM** (2010): A stromal heat shock protein 70 system functions in protein import into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Cell*, 22(1): 205-220
- Simone GW, Brown JK, Hiebert E, Cullen RE** (1990): New geminivirus epidemics in Florida tomatoes and peppers. *Phytopathology*, 80: 1063
- Singh ST, Priya NG, Kumar J, Rana VS, Ellango R, Joshi A, Priyadarshini G, Asokan R, Rajagopal R** (2012): Diversity and phylogenetic analysis of endosymbiotic bacteria from field caught *Bemisia tabaci* from different locations of North India based on 16S rDNA library screening. *Infect Genet Evol*, 12(2): 411-419
- Sinisterra XH, McKenzie CL, Hunter WB, Powell CA, Shatters RG Jr** (2005): Differential transcriptional activity of plant-pathogenic begomoviruses in their whitefly vector (*Bemisia tabaci*, Gennadius: Hemiptera Aleyrodidae). *J Gen Virol*, 86(5): 1525-1532
- Sseruwagi P, Legg JP, Maruthi MN, Colvin J, Rey MEC, Brown JK** (2005): Genetic diversity of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) populations and presence of the B biotype and a non-B biotype that can induce silverleaf symptoms in squash, in Uganda. *Ann. Appl. Biol.*, 147: 253-265
- Stanley J, Markham PG, Callis RJ, Pinner MS** (1986): The nucleotide sequence of an infectious clone of the geminivirus beet curly top virus. *EMBO J*, 5(8): 1761-1767
- Suárez-López P, Gutiérrez C** (1997): DNA replication of wheat dwarf geminivirus vectors: effects of origin structure and size. *Virology*, 227(2): 389-399
- Sufrin-Ringwald T, Lapidot M** (2011): Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. *Phytopathology*, 101: 281-289
- Sunter G, Bisaro DM** (1992): Transactivation of geminivirus AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell*, 4(10): 1321-1331
- Sunter G, Hartitz MD, Hormuzdi SG, Brough CL, Bisaro DM** (1990): Genetic analysis of tomato golden mosaic virus: ORF AL2 is required for coat protein accumulation while ORF AL3 is necessary for efficient DNA replication. *Virology*, 179(1): 69-77
- Tay WT, Evans GA, Boykin LM, De Barro PJ** (2012): Will the Real *Bemisia tabaci* Please Stand Up? *PLoS One*, 7(11): e50550
- Tesoriero L, Azzopardi S** (2006): Tomato yellow leaf curl virus in Australia. *NSW Department of Primary Industries, Primefact*, 220: 1-2
- Thao ML, Baumann P** (2004a): Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae). *Curr Microbiol*, 48(2): 140-144
- Thao ML, Baumann P** (2004b): Evolutionary relationships of primary prokaryotic endosymbionts of whiteflies and their hosts. *Appl Environ Microbiol*, 70(6): 3401-3406
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680

- Thompson WMO** (2011): The Whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyroidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants. Springer
- Thottappilly G, Bath JE, French JV** (1972): Aphid transmission characteristics of pea enation mosaic virus acquired from a membrane-feeding system. *Virology*, 50(3): 681-689
- Tian T, Rubio L, Yeh HH, Crawford B, Falk BW** (1999): Lettuce infectious yellows virus: in vitro acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *J Gen Virol*, 80(5): 1111-1117
- Tomás DM, Cañizares MC, Abad J, Fernández-Muñoz R, Moriones E** (2011): Resistance to Tomato yellow leaf curl virus accumulation in the tomato wild relative *Solanum habrochaites* associated with the C4 viral protein. *Mol Plant Microbe Interact*, 24(7): 849-861
- Tsvetkova NM, Horváth I, Török Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L** (2002): Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(21): 13504-13509
- Uzest M, Gargani D, Drucker M, Hébrard E, Garzo E, Candresse T, Fereres A, Blanc S** (2007): A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(46): 17959-17964
- Valverde RA, Sim J, Lotrakul P** (2004): Whitefly transmission of sweet potato viruses. *Virus Res*, 100(1): 123-128
- van den Heuvel JF, Bruyère A, Hogenhout SA, Ziegler-Graff V, Brault V, Verbeek M, van der Wilk F, Richards K** (1997): The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol*, 71(10): 7258-7265
- van den Heuvel JF, Verbeek M, van der Wilk F** (1994): Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J Gen Virol*, 75(10): 2559-2565
- Vetten HJ, Chu PWG, Dale JL, Harding R, Hu J, Katul L, Kojima M, Randles JW, Sano Y, Thomas JE** (2005): Nanoviridae, (In Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball [2005]: *Virus taxonomy: eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier/Academic Press, London, UK, Seite: 343–352)
- Viscarret MM, Torres-Jerez I, Agostini de Manero E, López SN, Botto EE, Brown JK** (2003): Mitochondrial DNA Evidence for a Distinct New World Group of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera:Aleyrodidae) Indigenous to Argentina and Bolivia, and Presence of the Old World B Biotype in Argentina. *Annals of the Entomological Society of America*, 96(1): 65-72
- Wan F, Zhang G, Liu S, Luo C, Chu D, Zhang Y, Zang L, Jiu M, Lü Z, Cui X, Zhang L, Zhang F, Zhang Q, Liu W, Liang P, Lei Z, Zhang Y** (2009): Invasive mechanism and management strategy of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotype B: progress report of 973 Program on invasive alien species in China. *Sci China C Life Sci*, 52(1): 88-95
- Wang H, Lei Z, Li X, Oetting RD** (2011): Rapid cold hardening and expression of heat shock protein genes in the B-biotype *Bemisia tabaci*. *Environ Entomol*, 40(1): 132-139
- Wanitchakorn R, Harding RM, Dale JL** (1997): Banana bunchy top virus DNA-3 encodes the viral coat protein. *Arch Virol*, 142(8): 1673-1680
- Wartig L, Kheyr-Pour A, Noris E, De Kouchkovsky F, Jouanneau F, Gronenborn B, Jupin I** (1997): Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology*, 228(2): 132-140
- Weeks AR, Velten R, Stouthamer R** (2003): Incidence of a new sex-ratio-distorting endosymbiotic bacterium among arthropods. *Proc Biol Sci*, 270(1526): 1857-1865

- Wege C, Pohl D** (2007): Abutilon mosaic virus DNA B component supports mechanical virus transmission, but does not counteract begomoviral phloem limitation in transgenic plants. *Virology*, 365(1): 173-186
- Wei T, Hibino H, Omura T** (2009): Release of Rice dwarf virus from insect vector cells involves secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *Commun Integr Biol*, 2(4): 324-326
- Weigel D, Glazebrook J** (2009): Dellaporta miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009(3): pdb.prot5178
- Wool D, Calvert L, Constantino LM, Bellotti AC, Gerling D** (1994): Differentiation of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hom., Aleyrodidae) populations in Colombia. *J. Appl. Ent.*, 117: 122-134
- Xie W, Yang X, Wang SI, Wu QJ, Yang NN, Li RM, Jiao XG, Pan HP, Liu BM, Feng YT, Xu BY, Zhou XG, Zhang YJ** (2012): Gene expression profiling in the thiamethoxam resistant and susceptible B-biotype sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*. *J Insect Sci*, 12(46): 1-14
- Xu J, De Barro PJ, Liu SS** (2010): Reproductive incompatibility among genetic groups of *Bemisia tabaci* supports the proposition that the whitefly is a cryptic species complex. *Bull Entomol Res*, 100(3): 359-366
- Xu Z, Horwich AL, Sigler PB** (1997): The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)<sub>7</sub> chaperonin complex. *Nature*, 388(6644): 741-750
- Yaakov N, Levy Y, Belausov E, Gaba V, Lapidot M, Gafni Y** (2011): Effect of a single amino acid substitution in the NLS domain of Tomato yellow leaf curl virus-Israel (TYLCV-IL) capsid protein (CP) on its activity and on the virus life cycle. *Virus Res*, 158(1-2): 8-11
- Yu H, Wan FH** (2009): Cloning and expression of heat shock protein genes in two whitefly species in response to thermal stress. *Journal of Applied Entomology*, 133(8): 602-614
- Yu H, Wan FH, Guo JY** (2012): cDNA Cloning of Heat Shock Protein Genes and Their Expression in an Indigenous Cryptic Species of the Whitefly *Bemisia tabaci* Complex from China. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 293-302
- Zchori-Fein E, Brown JK** (2002): Diversity of Prokaryotes Associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 95(6): 711-718
- Zhang J, Dong J, Xu Y, Wu J** (2012): V2 protein encoded by Tomato yellow leaf curl China virus is an RNA silencing suppressor. *Virus Res*, 163(1): 51-58
- Zhang W, Olson NH, Baker TS, Faulkner L, Agbandje-McKenna M, Boulton MI, Davies JW, McKenna R** (2001): Structure of the Maize streak virus geminate particle. *Virology*, 279(2): 471-477
- Zhou YC, Garrido-Ramirez ER, Sudarshana MR, Yendluri S, Gilbertson RL** (2007): The N-terminus of the Begomovirus nuclear shuttle protein (BV1) determines virulence or avirulence in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(12): 1523-1534
- Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F** (2004): Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*, 32(12): e103

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab.		Seite
2.1	Ligationsansatz für eine einfache Reaktion .....	31
2.2	Spezifizierung verwendeter Typ-II-Restriktionsenzyme .....	34
2.3	PCR Primer zum Nachweis der sekundären Endosymbionten von <i>B. tabaci</i> .	34
2.4	Primer für die PCR zum Nachweis von WmCSV und TYLCV .....	36
2.5	Primer und Sonden für die qPCR zur Quantifizierung von WmCSV, TYLCV, FBNSV, sowie 18S DNA, Hsp70 cDNA und Aktin cDNA aus <i>B. tabaci</i> .....	39
2.6	Primäre und sekundäre Antikörper zum immunologischen Nachweis von WmCSV- und TYLCV-Hüllproteinen, sowie <i>B. tabaci</i> Hsp70 .....	65
3.1	Sekundäre Endosymbionten von <i>B. tabaci</i> Population 63 und 95, sowie die Häufigkeit ihrer Detektion in getrennt untersuchten Männchen (♂) und Weibchen(♀) in Prozent (n =20, N = 120) .....	70
3.2	Reziproke $\Delta Cq$ -Mediane aus relativer Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus <i>B. tabaci</i> Hämolymphe über eine AAP von 6 Tagen .....	96
3.3	Mittelwerte der Virusgenommengen in virustragenden Individuen und deren Nachkommen die ausschließlich Kontakt zu virusfreien Nicht-Wirtspflanzen hatten .....	103
3.4	Faktoren in denen sich die relativen mRNA-Mengen bzw. cDNA-Mengen von virusfreien und virustragenden <i>B. tabaci</i> Individuen unterscheiden .....	112
3.5	Durchschnittlicher TYLCV-Gehalt der Weiße Fliegen nach Fütterung und Bonitur der Wirtspflanzen auf TYLCV-Infektion nach Fütterung von <i>B. tabaci</i> mit anti-Hsp70 Antikörpern bzw. Präimmunserum und anschließender TYLCV-Fütterung .....	116
6.1	Cq-Werte aus verschiedenen Standardreihen von WmCSV und TYLCV .....	154
6.2	Mediane und Mittelwerte der Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in ganzen Individuen virustragender Individuen von <i>B. tabaci</i> .....	158
6.3	Virusgenome pro gesamten Individuen von <i>B. tabaci</i> Population 63 und 95 nach 48 h Fütterung von WmCSV und TYLCV in gleichen Konzentrationen .....	158
6.4	Mittelwerte der WmCSV Genome pro Individuen von <i>B. tabaci</i> Population 63 und 95 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Kontakt mit infizierten Wirtspflanzen, im Anschluss an eine sechs stündige Hungerphase als exponentielle und logarithmische Zahlen .....	159
6.5	Mediane und Mittelwerte der Quantifizierung von WmCSV und TYLCV in Wirtspflanzen, sowie in ganzen Individuen, Mitteldärmen und primärer Speicheldrüsen von drei Populationen virustragender Weiße Fliegen .....	160
6.6	$\Delta Cq$ -Mittelwerte mit Standardabweichung aus relativer Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus <i>B. tabaci</i> Hämolymphe, sowie Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Reziproken der Einzelwerte .....	161

6.7	Virusquantifizierungsdaten aus Mitteldärmen von <i>B. tabaci</i> , die nach Kontakt mit einer virusinfizierten Wirtspflanze für 10 Tage auf Nicht-Wirtspflanzen transferiert wurden .....	162
6.8	Mittelwerte und Standardabweichungen der $\Delta Cq$ -Werte, sowie der reziproken $\Delta Cq$ -Werte, aus der relativen Quantifizierung von WmCSV und TYLCV aus Hämolymphe, nachdem die Insekten von infizierten Wirtspflanzen auf Nicht-Wirtspflanzen überführt wurden .....	163
6.9	Eingesetzte DNA-Mengen und erhaltende Cq-Werte der qPCR zur relativen Quantifizierung von FBNSV in Fababohnen- und Erbsenblättern .....	166

## 9 Lebenslauf des Autors

### Persönliche Daten

Name: Mario Kollenberg  
Adresse: Schermcker Str. 29, 39387 Oschersleben  
E-mail-Adresse: kollenberg-my@gmx.de  
Geburtsdaten: 24.08.1981 in Beckendorf-Neindorf  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### Bildungsweg

1992 - 1998 Johann Wolfgang von Goethe Sekundarschule  
1998 - 2002 Gymnasium Oschersleben  
2002 Abitur im Gymnasium Oschersleben  
2002 - 2003 Grundwehrdienst  
Oktober 2003 -  
September 2007 Studium der Biologie an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig  
Hauptfach: Mikrobiologie  
Nebenfächer: Molekulare Pflanzenbiologie  
Zellbiologie  
Genetik  
Oktober 2007 -  
Juni 2008 Diplomarbeit an der DSMZ (Abteilung Pflanzenviren)  
Thema:  
Charakterisierung eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E Gene (eIF4E) aus anfälligen und resistenten *Manihot esculenta* in Bezug auf Infektion mit dem *Cassava brown streak virus*.  
Note: sehr gut  
Seit Juli 2008 Promotionsvorhaben an der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig (Durchführung an der DSMZ, Abteilung Pflanzenviren):  
Thema:  
Differentielle Übertragung der Begomoviren *Watermelon chlorotic stunt virus* und *Tomato yellow leaf curl virus* durch Populationen der Weiße Fliege (*Bemisia tabaci*).